



Conséquences physiopathologiques de la dysbiose associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Sylvie Rajca

► To cite this version:

Sylvie Rajca. Conséquences physiopathologiques de la dysbiose associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066188 . tel-01214956

HAL Id: tel-01214956

<https://theses.hal.science/tel-01214956>

Submitted on 13 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE : ED 394 Physiologie Physiopathologie

Par Sylvie RAJCA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Sciences

Conséquences physiopathologiques de la dysbiose associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Directeur de recherche : Philippe SEKSIK

Soutenue le : 29 mai 2015

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Marion	LECLERC	Docteur INRA	Rapporteur
M. Stéphane	NANCEY	Professeur Université de Lyon	Rapporteur
Mme Patricia	LEPAGE	Docteur INRA	Membre du jury
M. Dominique	RAINTEAU	Docteur UPMC	Membre du jury
M. Jeremy	SELLAM	Professeur UPMC	Président et Membre du jury
M. Philippe	SEKSIK	Professeur UPMC	Membre invité du jury et Directeur de thèse

Remerciements

A Philippe Seksik pour sa disponibilité malgré ses nombreuses responsabilités, sa confiance dans la réalisation de ce projet qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse. Travailler à ces côtés tout au long de ces années fut un vrai bonheur.

A Dominique Rainteau pour son engouement et ses nombreuses idées dans la recherche, le temps qu'il m'a consacré tout au long de ce projet, ses longues discussions riches en enseignement qui m'ont donné gout à la recherche.

A Marion Leclerc et au Professeur Stéphane Nancey d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir consacré un temps précieux à la lecture de ce manuscrit

Au Professeur Jeremy Sellam de me faire l'honneur de présider cette thèse

A Patricia Lepage d'avoir participé à mon évaluation de mi-thèse et d'accepter d'en être membre du jury

A Joelle Masliah pour sa disponibilité et sa relecture minutieuse

A Lydie et Myriam pour leur aide précieuse en spectrométrie de masse, la disponibilité de la machine, leur bonne humeur et leur humour.

A Ginette Thomas, Ludmia Talbi et Henri Duboc pour leur aide indispensable toutes ces années, ce travail n'aurait pas pu se faire sans eux

A l'ensemble de personnes de l'équipe U1157-UMR 7023 de qui m'a accompagné pour mes premiers pas dans la recherche et m'a donné l'envie de poursuivre dans cette voie.

A toute l'équipe du service de gastro-entérologie de l'hôpital St Antoine, l'équipe médicale pour m'avoir soutenu et avec qui j'ai grandi ; l'équipe paramédicale pour leur dynamisme, leur travail au près des patients ainsi que la réalisation des prélèvements effectués.

A l'équipe du service d'hépatogastro-entérologie de l'hôpital Louis Mourier et surtout Marie Dior, qui m'a supporté et soutenu ces derniers mois.

Aux patients

A mes amis

A ma famille, merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui

A Olivier pour son soutien quotidien sans faille au cours de ces années, sa patience et sa compréhension. Merci d'être à mes côtés chaque jour.

A Anaïs qui éclaire ma vie

Abréviations

A

5ASA: acide 5- aminosalicylique
AB: acides biliaires
AHL : acyl-homosérine lactone
anti-I2 : anti dirigés contre *Pseudomonas fluorescens*
ARN: acide ribonucléique
ASCA: anticorps anti *saccharomyces cerevisiae*

B

BSH: Bile salt hydrolase

C

CA: acide cholique
CARD15: caspase recruitment domain-containing protein 15
CBir1 : Anti-Flagellin
CDCA: acide chenodeoxycholique
CRP: C reactive protein

D

DCA : acide desoxycholique
DIC : Dissociation induite par collision
DSS : Dextran Sulfate de Sodium

E

EMS: Enhanced MS Scan
EPI: Enhanced Product Ion Scan

F

FXR: Farnesoid -x- récepteur

G

GLP: glucagon-like peptide

H

hBD: Human beta defensin
HD: Human defensin
HMP: Human Microbiome Project
HNP: Human neutrophil peptide

HPLC-MS/MS: High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry

I

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

INF: Interferon

L

LCA: acide lithocholique

LPS: Lipopolysaccharide

M

MC: Maladie de Crohn

MDP: Muramyl dipeptide

MDR1: multi-drug resistance 1

MICI : Maladie chronique inflammatoire intestinale

N

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NLR: Nod-like receptor

NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain 2

O

OmpC: outer membrane porin C

P

pANCA: anticorps anti-cytoplasme périnucléaire des polynucléaires neutrophiles

PAM: Peptide antimicrobien

PON-1 : paraoxonase-1

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor

PSA: polysaccharide A

R

RAG2: Recombination activating gene 2

RCH: Rectocolite hémorragique

S

SFB: segmented filamentous bacterium

SII : syndrome de l'intestin irritable

T

TCM: triglycérides à chaîne moyenne
TGF: transforming growth factor
TGR5: G protein-coupled receptor for bile acids
TLCA: acide tauro-lithocholique
TLR: Toll-like receptor
TNBS: 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
TNF: Tumor necrosis factor
TRAF2: TNF receptor-associated factor 2
Tregs: cellules régulatrices T CD4 (+)

V

VS : vitesse de sédimentation
VDR : récepteur de la vitamine D

Table des matières

Remerciements	2
Abréviations	4
INTRODUCTION GENERALE	9
PREMIERE PARTIE.....	12
I. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	13
1) Généralités	13
2) Histoire naturelle et stratégies thérapeutiques.....	13
3) Facteurs prédictifs de la maladie	15
a. Facteurs prédictifs de l'évolution	15
b. Facteurs prédictifs de récurrence : le modèle de la récurrence post-op.....	16
II. Le microbiote intestinal	17
1) Ecologie intestinale	17
2) Structure.....	18
3) Techniques d'études	20
III. Rôle de l'écosystème intestinal dans la physiopathologie des MICI	22
1) Implication du microbiote	23
a. Etudes observationnelles humaines.....	23
b. Etudes animales.....	25
2) Mécanismes impliqués.....	25
a. Les bactéries et produits bactériens.....	25
b. Les peptides antimicrobiens.....	29
c. Les acides biliaires	31
d. Les phages.....	33
e. Les nutriments	35
f. Autres mécanismes.....	36
IV. Objectifs	38
DEUXIEME PARTIE	40
<i>Etude STORI : la dysbiose marqueur prédictif de récurrence</i>	41
<i>Les acides biliaires : conséquences au cours de la dysbiose</i>	52
<i>Les peptides anti-microbiens</i>	64

DISCUSSION, CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	66
la dysbiose marqueur prédictif de récidence	68
Modification des acides biliaires et conséquence au cours de la dysbiose	69
Les peptides antimicrobiens aux cours des MICI	71
Discussion générale et perspectives.....	73
ANNEXES.....	75
REFERENCES	104

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) touchent environ 1 personne sur 1000 en Europe occidentale et leur incidence est en constante augmentation. Du fait que ces pathologies affectent les sujets jeunes, avec un âge médian au diagnostic de 27 ans, elles peuvent durer plus de 50 ans dans le monde occidental, où l'espérance de vie des patients dépasse 70 ans. Ces maladies chroniques et invalidantes représentent un défi majeur pour les cliniciens confrontés à des patients complexes. Une meilleure compréhension de ces maladies permettrait d'améliorer la prise en charge de ces patients.

La physiopathologie des MICI fait intervenir quatre principaux acteurs : la susceptibilité génétique, les facteurs environnementaux, le système immunitaire et le microbiote. Le microbiote intestinal humain constitue un écosystème complexe dont l'impact sur la physiologie de l'hôte est aujourd'hui de mieux en mieux connu. Ces dernières années, l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathogénie des MICI a été mise en évidence. Chez ces patients, une dysbiose (i.e. un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal) a été décrite par plusieurs équipes dont la notre. Ainsi, la dysbiose associée aux MICI pourrait participer à l'activation chronique et inappropriée du système immunitaire intestinal de façon directe (par des substances diffusibles sécrétées ou par des motifs moléculaires associés aux pathogènes) ou indirectes liées aux modifications induites dans cet écosystème intestinal.

Le premier travail présenté dans cette thèse s'est appuyé sur ma pratique de clinicien au sein du service de gastro-entérologie de l'hôpital Saint Antoine. L'étude STORI, portant sur l'interruption de l'infliximab dans une cohorte de patients atteints de MC en rémission sous combothérapie (association de l'infliximab avec un autre immunosuppresseur) (1), nous a permis d'explorer les valeurs prédictives des modifications du microbiote dans un contexte clinique (article 1).

Mon travail de thèse s'est poursuivi par deux études expérimentales effectuées dans l'équipe de recherche (ERL INSERM 1057). Leur objectif était de mieux comprendre le rôle des perturbations du microbiote intestinal dans la physiopathologie des MICI. Nous avons exploré les conséquences de la dysbiose associée aux MICI sur le métabolisme des acides biliaires (article 2) et sur la sécrétion de peptides antimicrobiens (article 3). Ces travaux m'ont permis de découvrir et surtout d'apprécier pleinement la recherche fondamentale, en utilisant différentes techniques au sein du laboratoire mais également en participant à la mise au point de nouveaux dosages en spectrométrie de masse.

Ce manuscrit comprend aussi 5 publications présentées en annexe : deux revues centrées sur le rôle du microbiote dans les MICI, un article plus clinique évaluant l'impact du diagnostic de cancer sur l'évolution des MICI, une lettre sur les acides biliaires et les facteurs de risques cardio-vasculaires et un article original sur les modifications des acides biliaires dans le syndrome de l'intestin irritable.

Le microbiote intestinal apparaît donc comme un enjeu majeur de recherche, permettant de mieux comprendre les modifications observées chez les patients et devrait permettre, à terme, une meilleure prise en charge de ces patients par le développement de nouvelles pistes physiopathologiques et des stratégies thérapeutiques originales résultant de ces observations.

PREMIERE PARTIE

I. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

1) Généralités

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont composées de 2 pathologies : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Leur prévalence est de l'ordre de 1/1000 en Europe occidentale. Elles touchent la population jeune avec le plus fréquemment l'apparition de la maladie entre 20 et 40 ans. L'évolution des MICI est imprévisible, marquée par des alternances de périodes de poussées, plus ou moins sévères, et de rémissions. Le suivi, sur 25 ans, d'une cohorte de patient atteints de MC, a permis d'évaluer à 80% les patients ayant une poussée intense l'année d'entrée dans la maladie (2). Chaque année, seule la moitié des patients est en rémission. Ce pourcentage est stable au cours du temps, chaque patient évoluant d'année en année entre poussée et rémission. Après 20 ans d'évolution, 15% des patients sont devenus incapables de travailler. Trois phénotypes évolutifs de la MC ont été individualisés : la forme sténosante, la forme perforative et la forme inflammatoire (3, 4). Le phénotype se modifie, dans près de 50% des cas à 5 ans, passant du phénotype inflammatoire au phénotype sténosant (12%) ou perforatif (40%) (4, 5). Après 20 ans d'évolution, seul 12% des patients conservent un phénotype inflammatoire. Globalement, près de 80% des patients atteints de MC auront recours à la chirurgie et 10% nécessiteront une stomie définitive, principalement lié à l'évolution vers un phénotype sténosant ou perforatif, au cours de l'histoire de leur maladie. Chez les patients atteints de RCH, les lésions restent généralement superficielles; la colectomie est requise pour 10% à 30% des patients. Le pronostic est difficile à déterminer. La mortalité des patients atteints de RCH n'est pas supérieure à celle de la population, contrairement aux patients atteints de MC qui ont une mortalité plus grande que la population générale.

2) Histoire naturelle et stratégies thérapeutiques

L'évolution de la MC est marquée par la survenue de sténoses, de perforations intestinales ou de lésions ano-périnéales, nécessitant souvent le recours à la chirurgie (4, 5). L'âge moyen au diagnostic se situe entre 20 et 40 ans, la MC peut ainsi durer plus de 50 ans dans le monde occidental. Par conséquent, l'identification des critères prédictifs à travers une aussi longue période reste difficile. Cependant, l'évaluation de la sévérité de la MC ne doit pas être faussée par la prise en compte d'événements occasionnels (6). Par exemple, un patient peut être opéré une fois, puis obtenir une longue phase de rémission. La MC est souvent très active au cours des premières années, devenant par la suite de plus en plus stable (2). On peut considérer chaque complication de la MC comme un

phénomène de courte durée sans récurrence, (7) et, en l'absence de séquelles importantes, un tel événement ne devrait donc pas être considéré comme un marqueur de maladie grave.

Ces maladies chroniques et invalidantes représentent un défi majeur pour les cliniciens confrontés à des patients complexes. Les multiples aspects de la maladie nécessitent en effet une mise à jour constante pour les gastro-entérologues qui prennent soin des patients atteints de MC comme de RCH. La plupart des stratégies thérapeutiques actuelles visent à éviter les complications à court terme. Ces stratégies thérapeutiques n'ont donc pas modifié de façon significative l'histoire naturelle des MICI. Dans le sillage d'autres maladies chroniques, comme la polyarthrite rhumatoïde, le but de la thérapie est maintenant de passer du simple contrôle des symptômes à la modification de l'histoire naturelle pour éviter d'endommager l'intestin. Une approche visant la cicatrisation muqueuse endoscopique voire histologique est maintenant proposée. Elle est associée à un contrôle rigoureux de l'inflammation basé sur le suivi des symptômes et des biomarqueurs (8). De nombreuses options thérapeutiques sont offertes aux médecins et patients, et les traitements les plus efficaces doivent être instaurés afin de stopper la progression de la maladie ou d'empêcher la survenue de complications (9). Les cliniciens doivent toujours garder à l'esprit que la moitié des patients atteints de MC nouvellement diagnostiqués développera des complications (sténoses, abcès et /ou fistules) à 10 ans (4, 5). L'étape initiale et cruciale dans la gestion des cas les plus difficiles doit toujours favoriser l'optimisation des traitements médicaux conventionnels. En effet, notre arsenal thérapeutique pour les maladies chroniques est encore limité (5ASA, corticothérapie, thiopurines, methotrexate, anti-TNF, chirurgie) malgré l'arrivée de nouvelles biothérapies telles que le vedolizumab et le golimumab (10).

La quête de marqueurs cliniques comme biologiques apparaît essentielle à notre époque où l'on met en œuvre une prise en charge de plus en plus personnalisée du patient. Ces marqueurs nous servent à évaluer les patients nécessitant un traitement intensif d'emblée pour prévenir le risque d'évolution péjoratif de la maladie vers la sténose, la perforation, voire le cancer. Les marqueurs nous aident également à prédire si un patient peut bénéficier de la reprise d'un traitement en post opératoire et enfin à savoir quand arrêter certains traitements afin d'éviter les effets secondaires et les risques inutiles. Ces questions représentent le quotidien des praticiens dans la gestion de ces patients et y apporter des réponses permet d'améliorer leur prise en charge. Ces marqueurs sont donc d'une importance essentielle en termes de management thérapeutique. Il paraît important de traiter plus intensément les patients dont la maladie est potentiellement plus sévère sans surtraiter les autres.

3) Facteurs prédictifs de la maladie

a. Facteurs prédictifs de l'évolution

Cette question a été étudiée dans 2 cohortes de centres de références (11, 12) et dans des cohortes de populations (13-15). Dans les études de cohortes, l'âge au diagnostic, la localisation de la maladie, la consommation de tabac sont des marqueurs connus. Trois facteurs cliniques au moment du diagnostic ont été associés à une évolution péjorative au cours des 5 années suivantes : l'âge < 40 ans, la présence de lésions périnéales et le recours aux corticoïdes lors de la première poussée (11, 14, 16). Dans la cohorte de patients atteints de MC de l'hôpital St Antoine, le pronostic à long terme n'est pas lié à des caractéristiques anatomiques de la maladie, à l'exception de l'atteinte rectale. Le tabagisme et le faible niveau d'éducation sont associés à une évolution plus grave de la maladie. En outre, cette étude démontre qu'un âge supérieur à 40 ans au diagnostic et la durée de la maladie plus longue sont associés à une évolution moins sévère (17). L'évolution à long terme de la MC est faiblement prévisible par des facteurs cliniques. Parmi les facteurs associés à une évolution grave de la MC, le tabagisme demeure le facteur le plus difficile à surmonter pour les patients.

Avant l'ère des études d'association génomique, le rôle des facteurs génétiques dans la sévérité des MICI a été étudié par comparaison des MICI familiales et sporadiques. Même en cas de parent atteint d'une MICI, la gravité de la MC n'est pas affectée par l'histoire de la famille (18). L'identification des facteurs génétiques pronostiques dans les MICI est une option très attrayante car ils sont présents avant même le début de la maladie. Leur avantage principal est leur stabilité à long terme, ce qui n'est pas le cas pour de nombreux autres facteurs prédictifs tels que les paramètres cliniques ou les marqueurs sérologiques. Cependant, malgré un nombre croissant de loci de susceptibilité identifiés dans les MC et les RCH, très peu ont été associés à l'histoire de la maladie. La présence d'un polymorphisme de NOD2 est associée à une évolution clinique plus agressive de la MC; c'est à dire un risque plus élevé de sténoses intestinales, un besoin plus tôt d'une première chirurgie et une période de rémission réduite en post-opératoire (19-21). Les polymorphismes des gènes de multi-drug resistance 1 (MDR1), de TNF et d'inhibiteurs de facteurs de migration sont associés à une maladie réfractaire aux corticostéroïdes (22-24). En dépit de leur attrait, les marqueurs génétiques ne seront probablement jamais en mesure de prédire totalement l'évolution des MICI et leurs complications, en raison du rôle important des facteurs environnementaux dans la pathogenèse de la maladie. Mais ils pourraient être associés à d'autres facteurs, tels que les données cliniques ou microbiologiques, afin de construire des outils composites de prédiction pertinents.

De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer la valeur prédictive de marqueurs sérologiques. La présence d'ASCA, OmpC, anti-I2 et CBir1 est associée à l'apparition précoce de

complications (sténose ou fistule) et à la nécessité d'une chirurgie précoce de l'intestin grêle (25-27). La fréquence des complications de la maladie augmente avec le taux et le nombre croissant d'antigènes (ASCA, anti-I2, anti-OmpC, et anti-CBir1)(28). Des marqueurs biologiques tels que la CRP ou la VS, la calprotectine ou la lactoferrine fécales ont également été documentés (29, 30). Cependant, aucun des ces biomarqueurs individuels n'a assez de sensibilité ou de spécificité pour prédire l'activité de la maladie ou le pronostic. L'étude de l'expression de certaines protéines par microarrays sur des biopsies intestinales a permis de mettre en évidence une expression importante de la protéine TRAF2, intervenant dans la voie NFkB, facteur prédictif de rechute au cours de la RCH dans l'année suivante (31). L'étude de l'expression des gènes par microarrays sur les biopsies intestinales de patients atteints de MICI a également permis d'identifier des signatures transcriptionnelles prédictives de l'inflammation intestinale, de la réponse aux corticoïdes (corticodépendance ou résistance) ou du pronostic (32). Ces facteurs prédictifs de l'évolution restent, à ce jour, peu contributifs et ne permettent actuellement pas une utilisation dans la prise en charge quotidienne.

b. Facteurs prédictifs de récurrence : le modèle de la récurrence post-op

La récurrence post-opératoire peut être définie de différentes manières : endoscopique, radiologique, clinique ou chirurgicale. Le risque cumulé de récurrence clinique post opératoire est de 30 à 50% à 5ans et 45 à 70% à 10ans selon les études (33, 34). La rechute clinique est précédée d'une rechute endoscopique, localisée au niveau de l'anastomose et en amont, sur le segment iléal. Les facteurs prédictifs de récurrences ont, pour la plupart, été étudiés en post opératoire. Plusieurs facteurs ont été identifiés dont un des plus important reste le tabagisme, avec en moyenne un risque doublé en cas de poursuite du tabagisme actif (35, 36). D'autres facteurs cliniques de récurrence post opératoire ont été mis en évidence comme un antécédent de résection, la longueur de grêle réséqué, une maladie non colique, l'ancienneté de la maladie.(35, 36)

Le groupe REMIND (groupe de recherche sur les maladies inflammatoires digestives) constitue une cohorte depuis 2010 appelée POP REMIND dans le but d'identifier les facteurs prédictifs de la récurrence post opératoire de la MC. Les facteurs étudiés sont cliniques, biologiques, microbiologiques, immunologiques, histologiques et endoscopiques. Les premiers résultats, concernant les facteurs cliniques, ont été présentés récemment, correspondant au risque de récurrence endoscopique à 6 mois de l'intervention. Une récurrence endoscopique (score de Rutgeerts >1) était observée chez 44% des patients. Le sexe féminin, la présence d'une sténose ou d'une fistule étaient protecteurs de la

récidive endoscopique et le tabagisme était un facteur aggravant de ce risque (Allez et al. JFHOD 2015).

Une autre étude, réalisée par le GETAID (Groupe d'étude thérapeutique des affections inflammatoires digestives), a été réalisée récemment combinant les différents éléments cliniques et biologiques afin de déterminer les facteurs prédictif de rechute après l'arrêt de l'infliximab chez des patients en rémission clinique (1). L'identification d'un groupe à haut risque de rechute pouvait être faite à l'aide d'une combinaison de facteurs de risques (sexe masculin, absence de résection chirurgicale, leucocyte, hémoglobine, CRP, calprotectine fécale).

Sur le plan biologique, au cours de la RCH, dans une situation pré-opératoire, un niveau élevé de pANCA est associé à un risque de pochite chronique (37). Le dosage de pANCA pourrait également être utile pour prédire la réponse aux anti-TNF puisque le statut négatif est indépendamment associée à la réponse précoce à ce traitement au cours de la RCH (38). D'autres marqueurs biologiques ont été étudiés. Récemment, les résultats des dosages de calprotectine fécale et de CRP ultra sensible ont été présentés. La calprotectine fécale a une très forte valeur prédictive négative de récidive post opératoire dans l'année suivant la chirurgie et pourrait permettre d'éviter une coloscopie chez une partie des patients (Boschetti et al. JFHOD 2015).

Les résultats complets concernant des facteurs biologiques, microbiologiques, immunologiques, histologiques dans le cadre de la cohorte POP-REMIND sont très attendus. Certains de ces facteurs ont déjà été suggérés lors de recherches sur la physiopathologie des MICI. Une meilleure compréhension de la physiopathologie intestinale paraît nécessaire afin d'identifier de nouveaux marqueurs potentiellement prédictifs.

II. Le microbiote intestinal

1) Ecologie intestinale

Les communautés bactériennes sont omniprésentes, très diverses, et exercent des fonctions métaboliques clés qui façonnent les écosystèmes et assurent leur stabilité. La théorie et les approches de l'écologie microbienne ont fourni de précieux renseignements dans les interactions complexes qui se produisent entre un individu et ses milliers de milliards de bactéries, ayant des implications prometteuses pour les traitements personnalisés. Les études de séquençage internationales telles que MetaHit et le « Human Microbiome Project » (HMP) ont démontré que la flore intestinale contribue à l'apport nutritionnel de l'hôte, module son système immunitaire, métabolise et modifie les xénobiotiques (composés étrangers à un organisme vivant, y compris les

substances thérapeutiques), et peut protéger contre les agents pathogènes (39-41). Cette revalorisation du microbiote intestinal comme un élément central pour notre santé a conduit à un regain d'études explorant l'impact de l'alimentation, des antibiotiques et des probiotiques. Elle a ouvert la voie au développement de traitements thérapeutiques personnalisés. Comprendre l'implication du microbiote intestinal est donc un défi pour tous les investigateurs impliqués dans ce domaine et en particulier pour les cliniciens qui prennent soin de patients atteints de MICI. Le microbiote intestinal doit être considéré comme une partie d'un écosystème complexe, incluant tous les micro-organismes de l'intestin (bactéries, phages, levures, archae), le terrain de l'hôte (les cellules de l'hôte, le mucus, les conditions physico-chimiques, les IgA sécrétoires, les peptides antimicrobiens, les composés intra-luminaux en transit, etc ...) et les interactions entre tous ces acteurs. Les interactions entre les micro-organismes commencent à être décryptés par des modèles prédateur-proie (42) et / ou de concurrence dépendant du contexte (43). La co-évolution des micro-organismes et de l'hôte a permis l'instauration d'une relation symbiotique bénéfique. Ainsi, outre les interactions écologiques qui influencent la dynamique communautaire, les événements de symbiose se produisent entre les micro-organismes et les cellules de l'hôte façonnant la communauté microbienne ainsi que les conditions locales (44). La théorie écologique est donc essentielle pour comprendre le système du microbiote intestinal. Il faut donc rappeler que ce système implique des bactéries, des virus et en particulier les phages (42, 45), mais aussi des levures et des archae (46, 47).

2) Structure

À la naissance, tous les mammifères (et donc les humains) présentent un tube digestif stérile. La colonisation bactérienne de l'intestin du nourrisson commence à la naissance et est influencée par les habitudes alimentaires (laits infantiles vs allaitement maternel), le mode de naissance et l'exposition aux antibiotiques (48, 49). Le microbiote intestinal des nourrissons nés à terme par voie basse et allaités au sein est considéré comme la référence pour les études de modifications dans d'autres populations pédiatriques. À l'âge de 2-3 ans, le microbiote intestinal atteint une composition similaire à celle des adultes, et ne varie que très peu jusqu'à un âge avancé (50). Le microbiote intestinal « adulte » co-existe au sein de l'hôte avec des concentrations croissantes de l'estomac à la partie distale de l'intestin pour atteindre un niveau maximal dans le côlon (de 10^{11} à 10^{13} bactéries / g de contenu luminal) (51). Chaque individu abrite une collection unique de 10^{14} souches bactériennes et d'espèces dans l'intestin, bien que plus de 95 % d'entre eux puissent être attribué à quatre grands phylums: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (52)(figure 1).

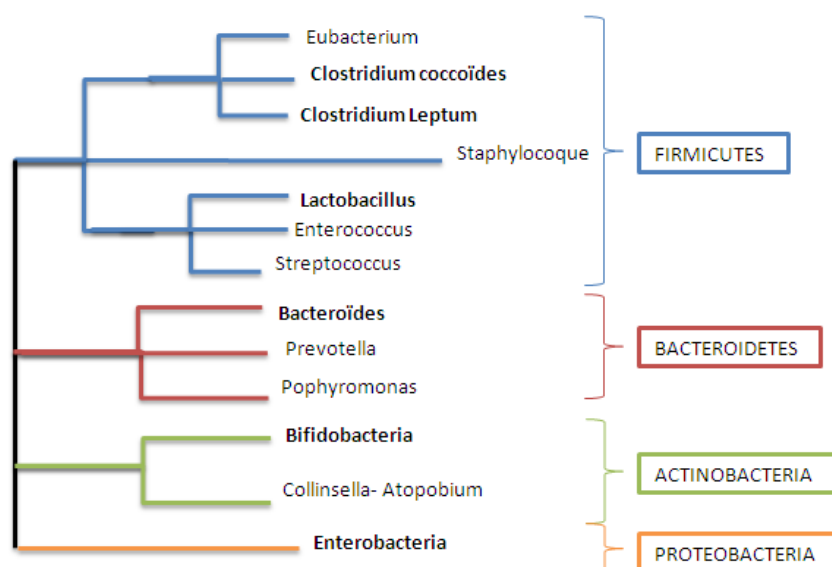


Figure 1. Répartition des phyla et groupes phylogénétiques du microbiote intestinal humain

Le nombre de bactéries dans l'intestin humain dépasse d'un facteur 10 le nombre de cellules humaines, et certains mécanismes finement réglés permettent à ces micro-organismes de coloniser et de survivre dans l'hôte dans une relation symbiotique. Le microbiote fournit des fonctions cruciales que l'humain ne peut exercer seul, et en retour l'hôte humain fournit au microbiote un environnement riche en nutriments. Après une perturbation du microbiote, comme lors d'un traitement antibiotique, les bactéries recolonisent les niches avec une composition et une diversité similaire au niveau de base, l'écosystème ayant un pouvoir de résilience très élevé. Les perturbations récurrentes pourraient conduire à une diminution de la capacité de résilience du microbiote intestinal (53). Compte tenu des caractéristiques du microbiote intestinal tels que la grande biodiversité, la stabilité dans le temps, la capacité de résilience, et de l'interaction symbiotique avec l'hôte, on peut voir le microbiote intestinal comme un organe caché qui exerce des fonctions physiologiques. Les deux principaux domaines de fonctions impliquées dans ce cadre sont les fonctions métaboliques et les défenses immunitaires. En ce qui concerne les fonctions métaboliques, le microbiote intestinal est capable de digérer des substrats inaccessibles pour les enzymes de l'hôte et de contrôler le stockage des graisses (54). Des altérations du microbiote intestinal pourraient participer au diabète ou à d'autres maladies métaboliques. En outre, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans l'induction, la formation, et le fonctionnement du système immunitaire de l'hôte (55). En retour, le système immunitaire a largement évolué afin de maintenir la relation symbiotique de l'hôte avec ces micro-organismes très divers et changeants. Utilisé de manière optimale, cette alliance système immunitaire - microbiote permet l'induction de réponses protectrices contre des agents pathogènes et le maintien de voies de régulation impliqués dans la

tolérance à des antigènes inoffensifs. Cependant, dans les pays à revenu élevé, la sur-utilisation des antibiotiques, les changements dans le régime alimentaire et l'élimination de partenaires constitutifs, tels que les nématodes, peuvent avoir sélectionné un microbiote qui manque de résilience et de diversité et qui devient donc incapable de maintenir des réponses immunitaires équilibrées. Le microbiote intestinal humain est exposé quotidiennement à divers types de perturbations, dont plusieurs peuvent entraîner des modifications importantes de la communauté et conduire à une dysbiose (39, 56). Ce déséquilibre est caractérisé par une perte de la diversité bactérienne et une expansion de bactéries généralement gardées à de faibles niveaux dans l'intestin en bonne santé ; ce déséquilibre peut résulter d'une variété de pathologies humaines dont les MICI. La dysbiose associée aux MICI est un cas particulier de dysbiose intestinale, où les modifications de structure de la communauté du microbiote intestinal sont aussi corrélées avec une dérégulation de la réponse immunitaire de l'hôte, conduisant à une inflammation sévère et chronique de l'intestin. Ainsi, le microbiote intestinal doit être considéré comme une biomasse dynamique, sensible aux perturbations, dont la structure peut être altérée chez les personnes souffrant de maladies intestinales (57, 58). Dans ce cadre, une boîte à outils conceptuelle pour décrire la communauté bactérienne est nécessaire pour comprendre les données du microbiote.

3) Techniques d'études

Le développement aux cours des années de différentes techniques et technologies et la disponibilité de nouveaux outils bioinformatiques de plus en plus puissants a permis de nouvelles avancées sur la description du microbiote. Initialement et jusqu'aux années 70, seules les techniques classiques de cultures bactériologiques étaient disponibles. Ces techniques ont permis d'isoler certaines bactéries et ont été utiles pour identifier certains pathogènes et leurs facteurs de virulences. Cependant, ces techniques ne permettent pas une description complète des communautés bactériennes commensales ainsi que leurs caractéristiques écologiques car la plupart des espèces du microbiote humain est difficilement cultivable en laboratoire, faute de milieux de culture appropriés. De plus, la numération bactérienne n'est pas un reflet exact de la réalité motivant ainsi les microbiologistes à se tourner vers de nouvelles techniques. Pour évaluer la structure de la communauté bactérienne en évitant les méthodes de culture, des outils moléculaires ont été développés sur la base des gènes codant pour la sous unité 16 S de l'ARN ribosomal. En fait, ces gènes sont considérés comme des molécules « sémantides » dont les mutations accumulées reflètent l'évolution des espèces. Les méthodes basées sur le séquençage de l'ARNr 16S sont limitées à l'analyse de la composition et de la distribution des bactéries dans une communauté spécifique (59). L'utilisation des gènes de l'ARN

ribosomal 16S comme marqueur phylogénétique a permis de décrire la diversité et la structure du microbiote. Bien qu'une base de données sur la plupart des espèces détectées par ARNr 16S ait été établie, les limitations techniques dans l'identification de bactéries empêchent l'analyse de chaque espèce. En outre, l'analyse de l'ARNr 16S par PCR limite l'analyse du microbiote à l'identification de bactéries. De nouvelles informations sur l'écosystème intestinal humain sont nécessaires pour comprendre le rôle exact du microbiote dans la santé et la maladie. Des questions essentielles persistent, telles que le potentiel génétique de la fraction bactérienne non cultivable de la flore intestinale ou le rôle exact de chaque bactérie dans l'écosystème (60). Depuis quelques années, l'utilisation de la bioinformatique a permis le développement d'une nouvelle génération d'outils. Le développement rapide des technologies de séquençage comme les installations à haut débit a permis non seulement de dépeindre des modifications dans la composition du microbiote intestinal dans un écosystème défini, mais aussi de s'attaquer à l'analyse fonctionnelle du microbiote. Le compartiment le plus étudié dans ce domaine reste le microbiote fécal, mais les données provenant des communautés bactériennes associées à la muqueuse analysées sur des biopsies ou des pièces opératoires sont également disponibles. Les méthodes de séquençages utilisées dans le cadre du projet européen MetaHIT, ont permis pour la première fois d'obtenir une cartographie complète du génome du microbiote intestinal humain (39). La métagénomique est un outil très puissant permettant une description précise du potentiel des micro-organismes présents dans un environnement mais ne permet pas de suivre les variations de leur activité ou de l'expression de leurs gènes. La métagénomique, basée sur l'ensemble du contenu génomique du microbiote, a commencé à mettre en avant les fonctionnalités microbiennes intégrées dans la flore intestinale humaine (61, 62). Une nouvelle méthode nommée shot-gun a reçu une attention considérable. Cette technique séquence directement l'ADN, permettant d'identifier d'autres micro-organismes que les bactéries. Cette méthode peut analyser directement les micro-organismes présents sur une fraction d'un échantillon et déterminer la région codant pour une protéine bactérienne à partir de l'ADN acquis. Cette méthode nécessite un programme informatique coûteux et sophistiqué qui peut traiter des données en quantité importante, nécessitant une expertise technique (63, 64). L'analyse métatranscriptomique permet l'étude de l'ARN messager, informant sur l'expression effective des gènes du microbiote. Cependant, les résultats sont variables selon les techniques utilisées, car l'ARNm n'est pas très stable (65). Enfin, la métabolomique permet une étude plus complète des métabolites exprimés par la communauté bactérienne (66). Ces outils, résumés dans la figure 2, permettent de répondre à de nouvelles questions mais ne donnent qu'un reflet incomplet de cet écosystème, ce qui reste insuffisant pour révéler la complexité de l'écologie intestinale avec ses interactions et sa variabilité au sein du microbiote.

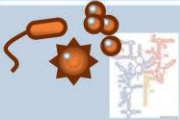
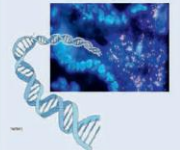

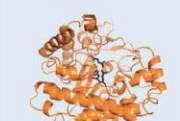
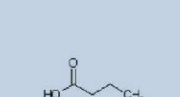
Meta-omics		Molecule	Knowledge	Limits	Clinical implications
Phylogeny		16S rDNA	<ul style="list-style-type: none"> ► Bacterial composition & diversity 	<ul style="list-style-type: none"> ► No information on bacterial functions ► Except archaea 	<ul style="list-style-type: none"> ► Composition dysbiosis ► Healthy or disease specific species
Metagenomics		Chromosomal genomic DNA	<ul style="list-style-type: none"> ► High resolution Microbiota profiling ► Genes contents from uncultivated microbes 	<ul style="list-style-type: none"> ► No information on microbial expressed functions 	<ul style="list-style-type: none"> ► Functional dysbiosis ► Healthy or disease specific microbial genes ► Toward diagnostics functional based studies
Metatranscriptomics		Messenger RNA/ cDNA	<ul style="list-style-type: none"> ► High resolution gene expression profiling ► Differential microbial gene expression various physiological/ environmental conditions 	<ul style="list-style-type: none"> ► Poor stability of bacterial mRNA ► Representativity unknown / Multiple purification steps needed ► No unique protocol 	<ul style="list-style-type: none"> ► Functional Dysbiosis ► Microbial activity kinetics ► Expressed genes at specific time and location ► Specific monitoring of active bacteria
Metaproteomics		Proteins/ Peptides	<ul style="list-style-type: none"> ► High resolution protein mapping and profiling ► Differential microbial proteins production under various physiological/ environmental conditions 	<ul style="list-style-type: none"> ► Many unknown proteins in databases ► Heterogeneous stability ► No unique protocol 	<ul style="list-style-type: none"> ► Function confirmed: genome annotation improvement ► Eucaryotes-procaryotes analogs identification ► Biomarkers
Metabolomics		Metabolites	<ul style="list-style-type: none"> ► Microbial and host Metabolic profiling ► Easy to perform on very low amount of material feces/serum/urine 	<ul style="list-style-type: none"> ► Many unknown metabolites in databases ► Strict Identification of compound tedious ► No unique protocol ► Combination of host and microbial molecules 	<ul style="list-style-type: none"> ► New pathways confirmed or identified ► High throughput metabolomic screening of biomarkers ► Easy translation to clinical setting

Figure 2 : les différentes techniques d'analyses de la phylogénétique à la métabolomique (Lepage et al. Gut 2013)

III. Rôle de l'écosystème intestinal dans la physiopathologie des MICI

Le microbiote intestinal représente l'un des quatre principaux acteurs intervenant dans la physiopathologie des MICI avec la susceptibilité génétique, les facteurs environnementaux et le système immunitaire. Les études familiales, en particulier chez les jumeaux, menées dans le cadre de ces pathologies suggèrent l'implication de facteurs génétiques et environnementaux (67). L'association génétique la plus clairement établie est celle de la mutation du gène NOD2/CARD15 dans la MC bien que de nombreux gènes aient été identifiés depuis comme des gènes de susceptibilité (68). La découverte de ces gènes a permis de confirmer l'importance des anomalies de l'immunité innée et de l'autophagie. Cependant, la génétique seule n'explique pas l'ensemble de la physiopathologie car seulement 30% des patients sont porteur d'une mutation NOD2. Les variations épidémiologiques dans le temps et dans l'espace ainsi que la concordance inférieure à 100% chez les

jumeaux monozygotes suggèrent l'implication de facteurs environnementaux. Le tabac et l'appendicectomie sont les seuls facteurs de risques actuellement bien identifiés. La théorie hygiéniste estime qu'un défaut d'exposition à des microorganismes pendant l'enfance pourrait participer à la pathogénie des MICI (69). Cette théorie est basée sur la moindre incidence des MICI dans les pays en voie de développement et son augmentation au cours de l'industrialisation d'un pays. La colonisation du microbiote au cours des premières années de vie a un effet important sur le développement et la régulation du système immunitaire. Une anomalie de communication entre le microbiote intestinal et le système immunitaire au niveau de la muqueuse a été identifiée comme un défaut de base conduisant à une inflammation chronique intestinale. Ainsi, l'expansion de notre savoir concernant le microbiote intestinal humain est indispensable pour mieux comprendre son implication dans la physiopathologie des MICI.

1) Implication du microbiote

a. Etudes observationnelles humaines

La topographie des lésions est un des premiers éléments évoqués pour impliquer le microbiote dans la pathogénie des MICI. L'inflammation dans le cadre des MICI atteint préférentiellement les zones à forte concentration en microorganismes, l'iléon distal et le colon (70). Plusieurs études ont montré que la concentration de bactéries associées à la muqueuse est significativement plus élevée chez les patients atteints de MICI que chez des sujets témoins (71). Dans les années 80, l'équipe d'Oxford a observé que la dérivation du flux luminal permettait une cicatrisation des lésions sous-jacentes chez les patients atteints de MC (72). La réintroduction de l'effluent provenant de l'intestin grêle dans le côlon de patients atteints de MC traités par chirurgie avec iléostomie et colostomie induisait une inflammation dans le côlon. Inversement, l'ultrafiltrat de ce chyme, ne contenant pas de bactéries n'avait pas cet effet pro-inflammatoire. Dans la même idée, l'équipe de *P. Rutgeerts* a montré qu'après résection de l'iléon terminal pour MC, la récurrence survenait chez 70 % des patients dans les six mois après rétablissement de la continuité digestive et ne s'observait pas chez les malades ayant une iléostomie (73). Cette récurrence survient préférentiellement au niveau de l'anastomose ou du segment intestinal d'amont. D'autres arguments, thérapeutiques, ont permis d'évoquer l'implication du microbiote dans l'inflammation. Les traitements antibiotiques, (ciprofloxacine, metronidazole) au cours des poussées de MC ou en prévention de la récurrence post opératoire ont montré une certaine efficacité. De plus, ces traitements antibiotiques dont la rifaximine ont montré une efficacité au cours de la pouchite (inflammation du réservoir iléal après coloproctectomie totale) avec une amélioration clinique, endoscopique et histologique. Quelques probiotiques ont également montré une efficacité

modérée dans certaines situations au cours des MICI. Les résultats les plus probants ont été obtenus au cours de la pouchite. Le probiotique VSL#3, contenant un mélange de plusieurs souches a prouvé son efficacité dans la prévention de la rechute au cours de plusieurs études (74-76). Au cours de la RCH, 3 essais testant *Escherichia coli* Nissle 1997 ont montré un effet équivalent à celui de la mesalazine en prévention de la rechute (77-79). Au cours de la MC, les preuves de l'efficacité des probiotiques, notamment *Escherichia coli* Nissle 1917 (80) et *Saccharomyces boulardii* (81, 82), dans le maintien en rémission et de la prévention des rechutes en post opératoire, restent peu nombreuses et surtout contradictoires.

L'ensemble de ces observations a permis de mettre en lumière le rôle incontournable du microbiote dans le développement des MICI. La mise au point au cours des années de nouvelles techniques et la disponibilité de nouveaux outils bioinformatiques ont permis de nouvelles avancées dans la description du microbiote au cours des MICI. De nombreuses études ont observé l'existence d'une dysbiose, chez les patients atteints de MICI (83-87). Ses principales caractéristiques sont :

- une restriction de la biodiversité des bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes*.
- une diminution de la proportion de certains groupes bactériens tels que *Clostridium leptum* dont le principal représentant est *F. prausnitzii*.
- une augmentation de la proportion de bactéries à gram négatif, en particulier les Entérobactéries dont *Escherichia coli* adhérent invasif qui a été décrit comme spécifiquement associé à la muqueuse iléale de patients atteints de MC (88).

L'abondance des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* est réduite de 10 à 100 fois dans les pièces de résection chirurgicale de patients atteints de MICI, par rapport aux témoins (85). La perte de *Firmicutes* est principalement attribuable à la réduction de l'abondance des espèces qui appartiennent aux *Clostridiales*, en particulier les membres de groupes *Clostridium* XIVa et IV. Ces études ont décrit les changements typiques dans la composition bactérienne intestinale des MICI, mais les rôles fonctionnels de ces micro-organismes, ou de l'ensemble d'une communauté dysbiotique, restent moins clairs. La dysbiose dans les MICI entraîne non seulement des changements structurels dans le microbiote intestinal, mais peut également provoquer des défauts importants dans de nombreuses fonctions métaboliques bactériennes avec un impact potentiel sur l'hôte. L'analyse métagénomique du microbiote des patients atteints de MICI révèle que non seulement le microbiote intestinal est caractérisé par des changements dans les populations bactériennes au cours de la maladie, comme décrit précédemment, mais que cette dysbiose est fonctionnellement très bien coordonnée. Les processus liés aux groupes *Clostridium* IV et XIVa sont réduits, en particulier la production d'acides gras à chaîne courte (89).

b. Etudes animales

Les modèles murins de colite expérimentale fournissent des arguments expérimentaux solides pour incriminer la microflore intestinale dans la pathogenèse d'une colite. En effet, dans la plupart des modèles, la présence d'une flore microbienne est nécessaire au développement d'une colite spontanée ou induite par des agents chimiques (70). L'étude des modèles murins a permis de mieux comprendre l'intrication de l'immunité innée, du microbiote et du développement de l'inflammation intestinale. Les souris interleukine 10 déficientes (IL-10^{-/-}) ont été largement utilisées pour modéliser les MICI. Des expériences consistant à coloniser des souris axéniques avec une espèce bactérienne (rendant ainsi les souris monoxéniques) ont montré que toutes les bactéries n'ont pas les mêmes effets pro-inflammatoires et peuvent également influencer sur le phénotype de l'entérocolite. Par exemple, chez ces souris, *Escherichia coli* induit une colite proximale alors que *Enterococcus faecalis* induit une colite distale (90). Une étude récente a permis de décrire dans ce modèle murin le changement du microbiote au cours de l'évolution, associé à l'apparition de l'inflammation (91). Ces modifications, marquées par la diminution de la diversité et l'expansion de certains groupes bactériens notamment les proteobactéries, incluant *E. coli*, sont les reflets de changements observés chez l'homme. Cette étude suggère l'apparition d'une dysbiose secondaire à la réponse immunitaire bien que la dysbiose puisse jouer un rôle dans l'entretien de cette réponse immunitaire et de l'inflammation. Récemment, le modèle de souris immunodéficientes atteintes de colite appelé TRUC (T-bet^{-/-} × RAG2^{-/-}, ulcerative colitis), a fait émerger un nouveau paradigme puisque le microbiote intestinal semble pouvoir transmettre la colite à des souris sauvages suggérant ainsi l'existence d'un microbiote « colitogénique » (92). L'étude de l'inflammasome, impliquant NLRP6, a également montré la transmission d'une colite via la sélection d'un microbiote. Le déficit en NLRP6 dans les cellules épithéliales coliques des souris réduit la production d'IL-18 et altère le microbiote via l'expansion du phylum *Bacteroidetes* (93).

2) Mécanismes impliqués

Le microbiote exerce de nombreuses fonctions. Il contribue, d'un point de vue métabolique, à la fermentation des polysaccharides, à la dégradation des protéines et au métabolisme de nombreuses molécules tels que les acides biliaires et les xénobiotiques. La dysbiose observée au cours des MICI pourrait avoir un impact direct ou indirect sur l'inflammation (87, 94).

a. Les bactéries et produits bactériens

Le microbiote est indispensable au développement de l'hôte et contribue au métabolisme et à la maturation du système immunitaire. De plus, il joue un rôle de barrière protectrice de l'épithélium

intestinal contre l'infection par des micro-organismes pathogènes. Le dialogue Hôte-Microbiote s'effectue sur une large surface de près de 400m². Les récepteurs de reconnaissance comme les TLR ou les NLR permettent de reconnaître les motifs moléculaires des micro-organismes qu'ils soient commensaux ou pathogènes. Lors du dialogue Hôte-Microbiote, les facteurs immunitaires de l'hôte peuvent favoriser la sélection d'un microbiote particulier. L'étude de *Garrett et al.* a permis de décrire une fonction inattendue du facteur de transcription T-bet, régulant la différenciation et la fonction des cellules du système immunitaire adaptatif et inné de l'hôte. Son rôle dans l'équilibre de l'immunité est complexe, et il n'est pas bien compris si T-bet favorise ou protège de l'inflammation intestinale chronique (95). Le déficit en T-bet dans un modèle de souris appelé TRUC, conduit à l'apparition d'une colite ulcérée spontanée et sévère ressemblant à la RCH, en l'absence de l'immunité adaptative et donne une susceptibilité accrue à la colite chez les souris immunologiquement intactes. La perte de T-bet chez ces souris sélectionne un microbiote particulier dit « colitogénique ». Le microbiote de ces souris a été transmis horizontalement par « co-housing » à des souris sauvages qui ont développé une colite. Cette colite est donc transmissible à des hôtes génétiquement intacts, par le biais du microbiote sélectionné (92, 95). Une étude récente a cherché à trier les bactéries associées à un revêtement en immunoglobuline A (IgA-SEQ) par cytométrie de flux et révélé qu'un niveau important de revêtement en IgA identifie des bactéries intestinales « colitogénique » dans un modèle de souris. Les bactéries intestinales sélectionnées sur la base d'un important revêtement en IgA confèrent une sensibilité à la colite chez les souris axéniques, suggérant que le revêtement en IgA identifie les bactéries commensales qui conduisent préférentiellement à l'inflammation intestinale (96).

D'un autre côté, le microbiote commensal peut influencer le système immunitaire de l'hôte. La colonisation de l'intestin grêle de souris avec la seule bactérie *segmented filamentous bacterium* (SFB) est suffisante pour induire l'apparition de lymphocytes T CD4 (+) helpers qui produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 (cellules Th17) dans la lamina propria. SFB adhère fermement à la surface des cellules épithéliales de l'iléon terminal de souris avec des cellules Th17, mais est absent de souris qui ont peu de cellules Th17. La colonisation par SFB est corrélée à une augmentation de l'expression de gènes associés à l'inflammation et aux défenses antibactériennes et donne lieu à une meilleure résistance à l'agent pathogène intestinal *Citrobacter rodentium* (97). La bactérie SFB, déjà connue comme un puissant inducteur des IgA de la muqueuse, joue probablement un rôle unique dans la maturation postnatale des fonctions immunitaires de l'intestin. Les changements dans la flore de nourrissons peuvent donc influencer le développement des réponses immunitaires de l'hôte (98). Le séquençage du génome de SFB isolé de souris monoxénique, classe phylogénétiquement SFB en tant que membre unique des *Clostridiales* avec un génome très réduit, abritant un seul chromosome circulaire

de 1,52 et 1,59 Mb codant 1346 et 1420 gènes de protéines. Le génome de SFB code typiquement pour des gènes de la fermentation anaérobie et la formation de spores et de flagelles, mais il ne contient pas de gènes codant pour la plupart des enzymes de biosynthèse d'acides aminés, entraînant sa grande dépendance de l'hôte. Des analyses comparatives révèlent que SFB est fonctionnellement lié aux membres du genre *Clostridium*. Cependant, SFB manque de gènes de virulence relatifs aux *Clostridia*. SFB est fonctionnellement distincte des autres bactéries appartenant aux *Clostridia*, indiquant une biologie relativement unique à son rôle de commensal de l'intestin par son absence de gènes de virulences comme de gènes du métabolisme des acides aminés qui le lie étroitement au métabolisme de l'hôte et de son immunité (56, 99).

Des cellules régulatrices T CD4 (+) (Tregs) jouent un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. Chez la souris, les Tregs sont plus abondants dans la muqueuse du côlon. Les composants du microbiote intestinal, notamment les clusters IV et XIVa du genre *Clostridium*, favorisent l'accumulation de cellules Tregs dans la lamina propria du colon. Les clusters de *Clostridium* IV et XIVa sont en proportion plus faible dans le microbiote fécal des patients atteints de MICI que dans celui des témoins sains (85). En outre, certains patients atteints de MICI ont une réduction spécifique de *Faecalibacterium prausnitzii*, une bactérie appartenant au groupe *Clostridium* IV (100). Les facteurs dérivés de *Clostridium* qui sont nécessaires pour l'induction des Tregs de la muqueuse sont actuellement inconnus. Parce que les souris axéniques colonisées avec trois souches de *Clostridium* ont montré un motif intermédiaire d'induction des Tregs entre les souris axéniques et les souris inoculées avec les 46 souches de *Clostridium*, il apparaît qu'un ensemble diversifié de métabolites produit par les 46 souches dans leur ensemble peut être nécessaire pour l'induction optimale des Tregs. L'inoculation orale de *Clostridium* au début de la vie de la souris aboutit à l'acquisition d'une résistance à la colite chez des souris adultes, ce qui suggère une nouvelle approche thérapeutique dans les maladies auto-immunes (101). À partir d'un échantillon fécal humain de témoin sain, une sélection a été appliquée pour obtenir des souris colonisées par le microbiote humain enrichi en espèces induisant les cellules Tregs. A partir de ces souris, 17 souches de bactéries ont été sélectionnées sur la base de leur potentiel à augmenter l'abondance des cellules Tregs et l'induction de molécules anti-inflammatoires importantes, y compris l'IL-10 et des cellules T inducible par co-stimulateur, dans les cellules Tregs pour l'inoculation à des souris axéniques. Le séquençage du génome a révélé que les 17 souches font partie des clusters IV, XIVa et XVIII des *Clostridia*. Ces 17 souches agissent comme une communauté pour fournir des antigènes bactériens et un environnement riche en TGF- β et ainsi aider à l'expansion et la différenciation des cellules Tregs. L'administration orale de la combinaison de 17 souches chez les souris adultes atténue la maladie dans des modèles de colite au TNBS et de diarrhée d'origine allergique (102).

Parce qu'aucun être humain ni souris n'abrite les mêmes souches bactériennes, une étude a suggéré que des facteurs plus répandus existent qui réglementent le nombre et la fonction des Tregs coliques. Les acides gras à courte chaîne produits par le microbiote intestinal régulent la prolifération et la fonction des Tregs coliques et protègent de la colite dans un modèle de souris Ffar2 (GPR43) de manière dépendante. Cette étude révèle qu'une classe abondante de métabolites bactériens est à la base de la coadaptation du microbiote et du système immunitaire adaptatif et favorise l'homéostasie colique (103).

Dans un modèle de récurrence post opératoire, une proportion plus faible de *F. prausnitzii* sur la muqueuse iléale réséquée des patients atteints de MC est associée à la récurrence endoscopique à 6 mois. Dans les cellules Caco-2 transfectées avec un gène rapporteur pour l'activité de NF- κ B, *F. prausnitzii* n'a aucun effet sur l'induction inflammatoire (IL-1) de l'activité NF- κ B, tandis que le surnageant abolit cette activité. La stimulation in vitro de cellules périphériques mononucléaires circulantes par *F. prausnitzii* conduit à des niveaux significativement plus faibles d'IL-12 et IFN- γ pro inflammatoire et une sécrétion augmentée d'IL-10 anti inflammatoire. L'administration orale soit de *F. prausnitzii* vivant soit de son surnageant réduit nettement la sévérité de la colite induit par le TNBS et tend à corriger la dysbiose associée à la colite (104). Dans une autre étude, le surnageant de culture de *F. prausnitzii* augmente le taux plasmatique de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-12) dans le plasma et la muqueuse du côlon, avec une amélioration des lésions coliques. Le surnageant de culture de *F. prausnitzii* supprime aussi la différenciation des cellules Th17 induite par les cytokines (TGF- β et IL-6) et des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse in vitro. Les métabolites de *F. prausnitzii* dans le surnageant de culture exercent un effet anti-inflammatoire plus fort que la bactérie elle-même. *F. prausnitzii* protège la muqueuse du côlon du développement des MICI par ses métabolites, suggérant un potentiel prometteur pour l'emploi de *F. prausnitzii* et de ses métabolites dans le traitement des MICI (105). Des travaux sont en cours dans notre laboratoire pour identifier les composants du surnageant de *F. prausnitzii* responsables de son effet anti inflammatoire.

La surface des muqueuses est en contact continu avec les bactéries. Les TLR servent de médiateurs de reconnaissance des molécules bactériennes pour éliminer les agents pathogènes. *Bacteroides fragilis*, bactérie commensale intestinale, va à l'inverse activer la voie TLR des lymphocytes T pour établir une symbiose avec l'hôte. La délétion de TLR2 des cellules Tregs conduit à une réponse immunitaire qui réduit la colonisation de *B. fragilis*. Le PSA, un facteur de symbiose, de *B. fragilis* active directement le TLR2 des Tregs selon un nouveau procédé qui engendre la tolérance muqueuse. *B. fragilis* délesté du PSA est incapable de retenir la réponse immunitaire de l'hôte et empêche la colonisation de sa niche spécifique. Par conséquent, contrairement aux agents

pathogènes dont les ligands de TLR déclenchent l'inflammation, certaines bactéries commensales exploitent la voie TLR pour supprimer activement les réactions immunitaires (106). Les bactéries commensales évoluent en symbiose avec l'homme, offrant des fonctions indispensables comme la digestion de polysaccharides complexes et le développement de l'environnement immunologique. A travers la production d'acides gras à chaînes courtes comme l'acétate, le butyrate ou le propionate, les bactéries commensales influencent positivement la prolifération des cellules épithéliales et leur différenciation. L'approche métabolomique combinée à la métagénomique (66) a permis d'évaluer les catalogues de métabolites d'un biote en fonction d'un contexte physiologique et environnemental donné. Son application sur les prélèvements fécaux de sujets sains et atteints de MICI a mis en lumière les différences de métabolome entre les individus sains, les patients atteints de MC et les patients atteints de RCH (107). Conformément aux études phylogénétiques précédentes, le métabolome des MICI a été caractérisé par des niveaux réduits de butyrate et d'acétate. Les auteurs ont conclu que la modification de la production d'acides gras à chaîne courte était corrélée avec la dysbiose au cours des MICI. La métabolomique a également permis de rechercher de nouveaux biomarqueurs parmi les métabolites issus du microbiote au cours de la MC (108). Les métabolites issus du métabolisme des acides gras, en particulier les dérivés de l'acide arachidonique sont particulièrement perturbés au cours de la MC (108).

L'ensemble de ces données place le microbiote comme un acteur direct de la modulation de l'inflammation intestinale. Cependant, d'autres mécanismes indirects sont probablement impliqués.

b. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont de petits peptides de moins de 40 acides aminés pour la plupart, sécrétés par les cellules de l'hôte. Ce sont des acteurs de l'immunité innée par leurs propriétés bactéricides et immunomodulatrices. A l'heure actuelle, 1500 PAM ont été répertoriés dans l'ensemble des formes de vies. Leur spectre d'activité est très large incluant les bactéries gram positif et gram négatif, les mycobactéries, les virus, les parasites et les levures grâce à leurs caractéristiques physicochimiques cationiques amphiphiles. Leur classification est basée sur leur structure secondaire : hélice alpha, feuillet bêta et linéaire flexibles (109). Chez l'homme, les PAM sont sécrétés par les nombreuses cellules (épithélium, monocytes...). Dans le tube digestif, il en existe deux classes majeures: les défensines et les cathélicidines. Les défensines sont des peptides cationiques amphiphiles d'environ 4kDa. Elles sont caractérisées par la présence de 6 cystéines définissant la position de 3 ponts disulfures intra-moléculaires. Ces ponts disulfures permettent la stabilisation de la structure, bloquant la protéolyse. Leurs propriétés physico-chimiques permettent

de rompre la membrane externe des bactéries. En effet, les PAM cationiques interagissent avec les phospholipides membranaires bactériens chargés négativement pour créer des pores membranaires induisant la lyse bactérienne. Grâce à leur structure conférée par les ponts disulfures, les défensines ont également une action de type chimiotactique pour certaines cellules (lymphocytes, cellules dendritiques...) liant l'immunité innée à l'immunité adaptative (110). Les défensines se divisent en 2 sous-groupes chez l'homme : les α et les β défensines. Il existe 6 α défensines : HNP1 à 4, HD5 et HD6. Les défensines HNP 1 à 4 sont stockées dans les granules azurophiles des polynucléaires et sont utilisées lors de la phagocytose. Les défensines HD 5 et 6 sont sécrétées par les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes de l'intestin grêle et dans le colon (métaplasie Paneth-like). Les défensines HD5 et 6 ont une activité bactéricide dirigée contre les bactéries gram positif telles que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, les bactéries gram négatif telles que *E. coli* ou *S. typhimurium*, mais aussi contre les levures comme *C. albicans*. L'expression des α -défensines est constitutive et ne nécessite pas d'induction bactérienne (111). Leur sécrétion est régulée par NOD2 et peut être stimulée par certains composants bactériens (LPS, MDP) (figure 3) et des agonistes cholinergiques (112). Les β -défensines sont sécrétées majoritairement par les cellules épithéliales. Il existe six β -défensines : hBD1 à 6. Leur spectre d'activité est dirigé contre les bactéries gram négatif et les levures comparativement aux α défensines et elles montrent moins d'efficacité sur les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*). La défensine hBD1 a une expression constitutive mais peut être modulée dans certaines situations : les toxines bactériennes (*Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotoxinogène) peuvent diminuer la production de hBD1 intestinale (113), un déficit en PPAR gamma diminue l'expression de hBD1. La défensine hBD2 au contraire est inductible. De nombreuses études montrent une augmentation de hBD2 au contact de diverses bactéries (*Lactobacilles*, *E. coli* Nissle 1917 ...), composants bactériens (LPS, peptidoglycane) ou protéines de l'inflammation (IL 1, TNF- α , INF-gamma)(111). Certains travaux ont mis en évidence une défaillance de la barrière intestinale dont un déficit en défensines au cours de la MC. En effet, l'expression iléale des α -défensines, notamment HD5, est diminuée chez les patients atteints de MC iléale, et ce d'autant plus lorsqu'il existe une mutation NOD2 (112). La conséquence d'une mutation de ATG16L1 pourrait être une répercussion sur la différenciation et la fonction des cellules de Paneth. *Cadwell et al.* ont démontré que les cellules de Paneth de souris déficientes en ATG16L1 (Atg16L1HM) présentent des anomalies notables dans la voie de l'exocytose de granules contenant les défensines (114). L'expression de la β -défensine hBD2 est faiblement induite chez les patients ayant une MC colique, comparée aux patients atteints de RCH, comme s'il existait un défaut d'induction de la synthèse de cette défensine colique au cours de la MC (115). Un déficit en hBD1, synthétisée par les colonocytes, est également incriminé dans la physiopathologie des MICI. Cependant, une étude récente a remis en

cause l'hypothèse d'un déficit primitif en défensine au cours de la MC et rapporté que le déficit en α -défensine dans la muqueuse n'était trouvé qu'en zone iléale enflammée et pas en zone saine (116). L'accumulation d'altérations de la barrière muqueuse intestinale, comme la diminution de production de défensines, pourrait être responsable de la dysbiose observée au cours des MICI ou de son entretien.

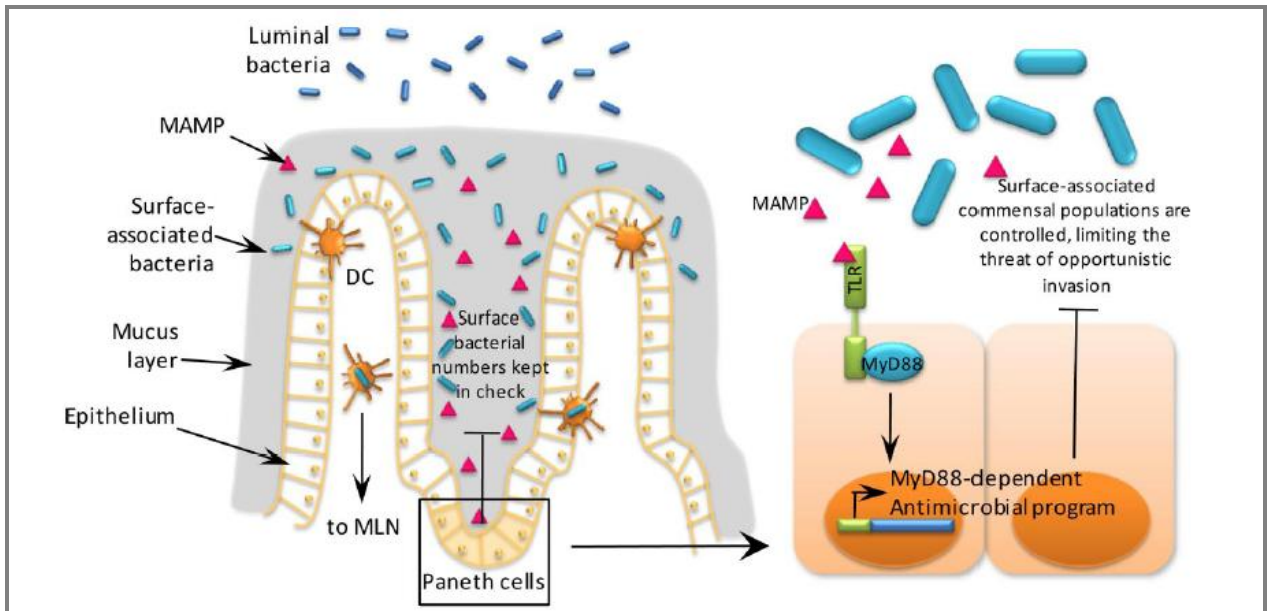


Figure 3 : Modèle de fonctionnement des cellules de Paneth de l'intestin grêle (Vaishnava et al. PNAS 2008)

c. Les acides biliaires

La biotransformation des acides biliaires, est réalisée dans la lumière Intestinale par certaines bactéries du microbiote intestinal. Les acides biliaires sont synthétisés par le foie sous la forme d'acides biliaires primaires, l'acide cholique (CA) et l'acide chenodeoxycholique (CDCA). Ils sont ensuite conjugués avec de la glycine ou de la taurine avant excrétion dans les voies biliaires. Les acides biliaires sont ensuite modifiés dans la lumière intestinale par le microbiote qui effectue deux réactions enzymatiques : La déconjugaison de la taurine ou glycine par la Bile Salt Hydrolase (BSH) (117) est la première étape avant la transformation par déshydroxylation, conduisant à la production d'acides biliaires secondaires, l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA) (118). La réabsorption active des acides biliaires dans l'iléon terminal par des transporteurs spécifiques permet le retour des acides biliaires au foie *via* la circulation portale. Dans le foie, les acides biliaires libres sont reconjugués avec la taurine ou la glycine avant excrétion par les voies biliaires dans la lumière intestinale. Cette boucle métabolique constitue le cycle entéro-hépatique des acides biliaires (figure 4)(119). Compte tenu de la place centrale du microbiote dans ce cycle, la dysbiose associée aux MICI pourrait induire un dysmétabolisme des acides biliaires et affecter l'homéostasie

intestinale. En plus des fonctions métaboliques bien connues pour l'absorption des lipides, les acides biliaires agissent également comme des molécules de signalisation qui régulent leur propre synthèse (120), participent aux défenses de la muqueuse intestinale par leurs propriétés antibactériennes (121, 122), et peuvent agir comme des molécules anti-inflammatoires capable de réduire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α dans les monocytes et les macrophages *via* l'inhibition de NF- κ B (123-126). L'activation du Farnesoid -X- récepteur (FXR), ainsi que le récepteur de la vitamine D (VDR) , par les acides biliaires primaires CA et CDCA provoque une série d'effets génomiques essentiels pour la régulation des lipides, du cholestérol, des acides biliaires, et de la réponse immunitaire locale au niveau intestinal et hépatique (127). La diminution de l'expression de FXR, principal récepteur des acides biliaires, se traduit par une dysrégulation à plusieurs niveaux du glucose, des lipides, du cholestérol et du métabolisme des protéines, mettant en évidence le rôle essentiel de ce récepteur dans le maintien de l'homéostasie entéro-hépatique (127). En outre, les acides biliaires exercent des effets non génomiques (127) attribués à l'activation d'un récepteur de surface cellulaire nommée TGR5. TGR5 s'exprime principalement dans le tissu adipeux brun, la rate, des macrophages / monocytes, la vésicule biliaire et l'intestin (128). Dans les cellules cibles, l'activation de TGR5 par les acides biliaires secondaires, le LCA et le tauro-LCA (TLCA), augmente les concentrations intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et provoque l'internalisation du récepteur (129). Dans des cellules intestinales endocrines qui surexpriment le récepteur, l'activation de TGR5 par les acides biliaires et des agents alimentaires stimule la sécrétion de glucagon-like peptide (GLP) -1, une hormone insulinothèque qui régule la sécrétion d'insuline et de glucagon accompagnée d'une augmentation de la motilité intestinale et de l'appétit (129, 130). Outre sa localisation intestinale, TGR5 a été détecté dans les macrophages circulants et hépatiques où il exerce une activité immunomodulatrice (127, 129). Certains arguments génétiques existent pour impliquer TGR5 dans les MICI. Le locus du gène TGR5 est sur le chromosome 2q35, à proximité d'un variant génétique (polymorphisme du nucléotide rs12612347) associé à la fois à la cholangite sclérosante primitive et à la RCH (131). Les souris invalidées pour TGR5 développent une morphologie anormale des cellules de la muqueuse colique et une altération des jonctions serrées épithéliales avec augmentation anormale de l'expression et de la distribution subcellulaire de la zonuline 1 aboutissant à une augmentation de la perméabilité intestinale et la susceptibilité à développer une colite sévère en réponse au DSS. Dans les monocytes, la ciprofloxacine, identifié comme un ligand de TGR5, accroît la concentration d'AMPC et atténue la libération de TNF α via TLR4. Le traitement des souris ayant développé une colite au TNBS, avec la ciprofloxacine et l'acide oléanolique, un ligand bien caractérisé de TGR5, abroge les signes et les symptômes de la colite. L'expression colique de l'ARNm de TGR5 augmente dans des modèles murins de colite et dans les

tissus de patients atteints de la MC (132). Un autre travail a montré que dans des cellules mononuclées humaines isolées dans la lamina propria de patients atteints de la MC, l'expression des ARNm de TGR5 est augmentée chez les patients présentant une inflammation par rapport aux patients sans inflammation (133). Cette augmentation est à mettre en rapport avec un effet anti-inflammatoire des acides biliaires secondaires, ligands de TGR5, entraînant une diminution de la production de TNF- α des macrophages qui devrait permettre de contrebalancer le cercle vicieux de l'inflammation dans les MICI. Ceci suggère qu'un dysmétabolisme des acides biliaires pourrait potentiellement influencer l'évolution des MICI, par son action sur une inflammation intestinale.

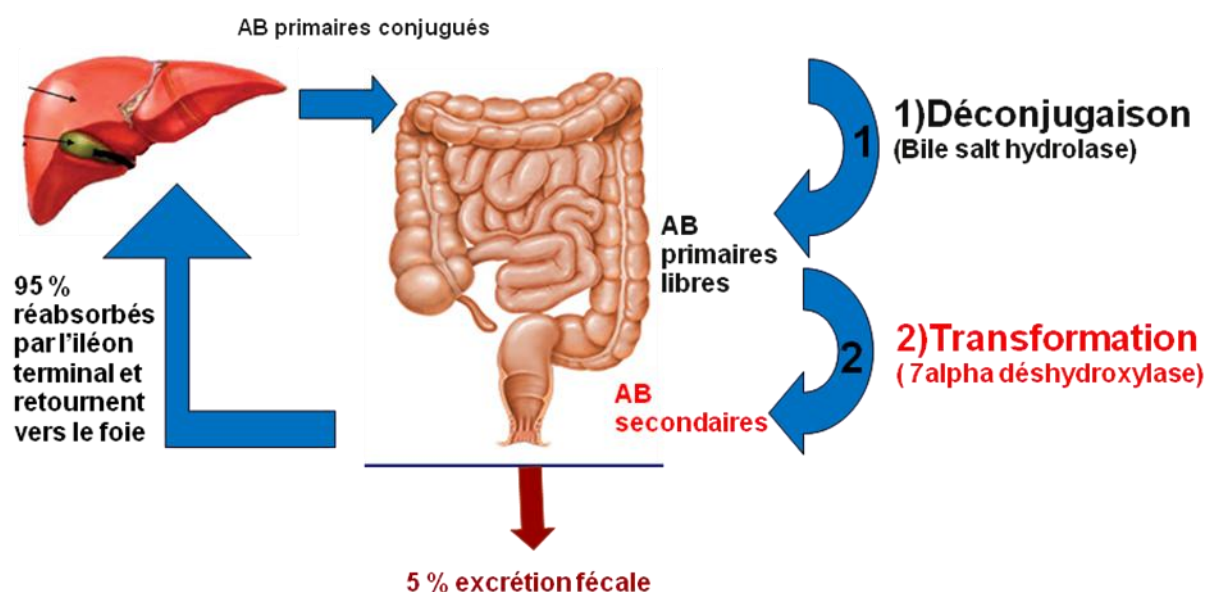


Figure 4 : Cycle entéro-hépatique des acides biliaires

d. Les phages

Les phages représentent une population 10 fois plus abondante que les bactéries, représentant l'entité biologique la plus importante. Compte tenu de leur abondance et de leur interaction avec les bactéries, leur rôle apparaît essentiel. Les progrès récents dans la technologie de séquençage ont conduit à la découverte d'une diversité du virome entérique humain constitué des bactériophages, ainsi que les virus eucaryotes (134-136). La métagénomique a permis de montrer l'importance de la présence de gènes de bactériophages insérés dans le génome bactérien. De nouvelles données indiquent que le virome peut profondément influencer la physiologie de l'hôte (137, 138). Les bactériophages peuvent jouer un rôle direct dans la physiologie intestinale ou modifier le microbiote bactérien à travers les relations prédateur-proie (42, 139). En détruisant certains micro-organismes, les phages contribuent au maintien de la diversité des espèces bactériennes. Le virome, dont une

grande partie est composée de bactériophages, contient les éléments génétiques les plus divers sur la terre et commence seulement à être caractérisé par le séquençage (138). En l'absence de maladie, les populations bactériophages entériques présentent une diversité importante entre les individus et sont stables dans le temps (134, 136). Les bactériophages de l'intestin humain sain sont principalement à ADN double brin (ADNdb) *Caudovirales* ou ADN simple brin (ADNsb) *Microviridae*. Ils infectent de façon latente leurs hôtes bactériens et génèrent une descendance virale qui peuvent infecter et tuer d'autres bactéries (140). Cependant, des stimuli environnementaux tels que les antibiotiques, induisent la production de bactériophages infectieux qui lysent leur hôte bactérien et infectent les cellules voisines portant des récepteurs spécifiques (141, 142). Ce processus libère des virions infectieux dans l'intestin, qui peuvent être purifiés et analysés. Les virus eucaryotes peuvent provoquer une rupture de la barrière épithéliale à l'origine d'une inflammation clinique chez l'hôte porteur de facteurs de risques génétiques de MICI comme les études sur les souris porteuses de mutations *Il-10* ou *ATG16L1* l'ont montré (143-145). Des altérations dans l'abondance des bactériophages ont été suggérées dans la MC (146, 147); Au cours de la MC, la muqueuse ulcérée contient moins de bactériophages libres comparée à la muqueuse non ulcérée. Le rôle des bactériophages dans la physiopathologie des MICI est depuis longtemps suspecté et plusieurs hypothèses ont été émises. Les phages peuvent rapidement entrer en phase lytique et détruire localement des bactéries conduisant à une dysbiose. Ils peuvent également changer les « recognitions patterns » des bactéries, via les TLR. Enfin les phages peuvent cibler des modulations spécifiques de l'hôte. Une étude récente a caractérisé le virome entérique humain normal et le virome entérique chez les MICI par séquençage de l'ADN à partir d'échantillons fécaux provenant de patients atteints de MC, de RCH et de sujets contrôles (137). L'analyse a révélé la baisse attendue de la richesse et de la diversité bactérienne accompagnée d'une augmentation frappante de la richesse en bactériophages associée aux MICI. Les changements spécifiques du virome entérique se produisent dans la MC comme dans la RCH, avec une expansion significative de la richesse taxonomique des bactériophages *Caudovirales*. Surtout, bien que ce changement ait été observé dans la MC et la RCH, les virus responsables du changement semblent différer entre les deux maladies, ce qui suggère que le virome est spécifique pour les MC par rapport aux RCH. Ces données démontrent, pour la première fois, que des changements uniques dans le composant bactériophage du virome entérique se produisent dans MC et la RCH, soulevant la possibilité que ces changements puissent contribuer à la pathogenèse de la maladie, peut-être par une relation prédateur-proie entre les bactériophages et leurs hôtes bactériens.

e. Les nutriments

L'alimentation est une voie de recherche intuitive dans la physiopathologie des MICI pour deux raisons : d'une part l'inflammation affecte le site d'absorption des nutriments, d'autre part les nutriments modifiés par le microbiote sont mis en contact avec l'épithélium.

Des méta-analyses ont montré que la nutrition entérale a une certaine efficacité chez les adultes atteints de MC active (148, 149). En population pédiatrique, une méta-analyse a montré un taux de rémission équivalent entre la nutrition entérale et la corticothérapie (150). La nutrition entérale peut être utile pour maintenir la rémission chez les patients atteints de MC (151, 152). De nombreux aliments ont été impliqués dans l'étiologie des MICI. Les apports alimentaires élevés en matière grasse, en acides gras polyinsaturés, comme les acides gras oméga-6, et en protéines animales sont associés à un risque accru de MC et de RCH (153-155). La présence de traces d'émulsifiants et de détergents utilisés dans la cuisine moderne semble concourir à l'émergence des MICI car ils augmentent la translocation bactérienne (153-155). La curcumine, aux propriétés anti-inflammatoire par inhibition de NF- κ B, s'est également montré bénéfique dans la réduction de la colite dans certains modèles de RCH (154, 155). Des preuves s'accumulent sur le rôle des facteurs nutritionnels dans le cadre de l'évolution globale du style de vie devant l'incidence croissante des MICI. Cependant, aucune recommandation diététique spécifique ne peut être donnée actuellement pour diminuer le risque de développer la MC ou la RCH. Il est en effet difficile d'identifier clairement la place de l'alimentation dans la survenue des MICI : le lien entre un changement des habitudes alimentaires et l'apparition de pathologies est difficile à repérer, et la compliance des patients au cours des essais est difficile à apprécier (156). Le comportement nutritionnel peut avoir un impact sur la sélection du microbiote. En effet, récemment, trois «entérotypes» distincts de la composition bactérienne de l'intestin dans la population humaine ont été mis en évidence (157). Ces « entérotypes » sont caractérisées par genres dominants (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*) et leurs groupes phylogénétiques concomitants. En fonction du comportement nutritionnel (type d'alimentation, consommation de probiotiques et de prébiotiques) un impact sur les populations bactériennes a été observé et une association à long terme a été mise en évidence entre les habitudes alimentaires et ces entérotypes. Cette découverte récente que l'appartenance à l'un ou l'autre entérotipe pourrait être modulée par le régime alimentaire ouvre de nouvelles perspectives dans les domaines des MICI, de la nutrition et des stratégies thérapeutiques (157). D'autre part, la dysbiose apparaît impliquée en affectant l'absorption des nutriments. L'analyse métabolomique des prélèvements fécaux de sujets sains et atteints de MICI a mis en lumière les différences de métabolome entre les individus sains, les patients atteints de MC et les patients atteints de RCH. Ces différences se caractérisent par des niveaux réduits de méthylamine et de triméthylamine, et une

quantité élevée d'acides aminés (107). Une autre étude comparant des patients atteints de RCH, des sujets sains et des patients atteints de syndrome de l'intestin irritable (SII), décrit une augmentation de la quantité de taurine et de cadavérine au cours de la RCH comparé aux sujets sains et aux SII (158). Ces différences de profils peuvent servir de marqueurs de la maladie mais également avoir un impact sur l'inflammation. Les effets de triglycérides à chaîne moyenne (TCM) alimentaires sur une colite expérimentale induite par le TNBS ont été étudiés chez le rat (159). L'induction de l'IL-1 β , du TNF- α et de la protéine inflammatoire des macrophages-2 (MIP-2) dans le côlon a été atténuée par les TCM alimentaire. En outre, l'activité myéloperoxydase dans le tissu colique était considérablement réduite chez les animaux nourris avec les rations de TCM par rapport à ceux nourris les régimes de contrôle. Les TCM alimentaires améliorent donc de façon significative la colite induite chimiquement (159). Une meilleure compréhension de l'impact des nutriments sur le microbiote et l'immunité pourrait permettre une modification de régimes alimentaires, enrichis en nutriments anti inflammatoire comme les TCM ou épurés de nutriments pro-inflammatoires, qui pourrait améliorer la prise en charge des patients.

f. Autres mécanismes

D'autres mécanismes indirects peuvent être évoqués mais dont les données sont encore préliminaires au cours des MICI.

Le quorum sensing

Au sein d'un écosystème, les populations bactériennes communiquent entre elles via la production et la détection de petites molécules diffusibles. Parmi ces modes de communication, on retrouve le quorum sensing de type I impliquant la production d'acyl-homosérine lactones (AHLs). Ces molécules sont connues pour réguler l'expression de nombreux gènes bactériens tels que ceux impliqués dans la virulence, la production de molécules antimicrobiennes ou encore la formation de biofilms. Bien que largement étudié dans d'autres écosystèmes bactériens, le quorum sensing de type I n'a fait l'objet que de quelques descriptions chez des pathogènes et entérobactéries de l'écosystème intestinal humain. Des arguments expérimentaux indirects suggèrent que ce type de quorum sensing pourrait être en jeu au cours des MICI. En effet, il a été récemment observé que la paraoxonase-1 (PON-1), une enzyme extracellulaire de l'épithélium digestif, possède une activité d'hydrolyse des AHLs (quenching du quorum sensing). Ces travaux ont montré que l'activité de l'enzyme PON-1 est significativement diminuée chez les patients présentant une MICI active par rapport à des sujets sains (160) et que le polymorphisme de PON-1 (allèle 192R), conduisant à une plus forte activité

paraoxonase, est moins fréquent chez les patients atteints de MICI que chez les sujets sains (161). Au cours des MICI, l'augmentation de la biodisponibilité des AHLs pourrait ainsi être impliquée dans l'expansion de certaines entérobactéries et pourrait participer au maintien de la dysbiose. Une étude sur leur implication au cours des MICI est actuellement en cours dans notre équipe de recherche.

Le mucus

Le mucus joue également un rôle dans la protection contre l'inflammation. Les cellules intestinales à mucus sécrètent en grande quantité des protéines hautement glycosylées qui forment une double couche de mucus (162). La couche la plus interne, proche de l'épithélium, contient des PAM alors que la couche externe de mucus est colonisée par le microbiote intestinal et est le siège du clivage protéolytique de la mucine Muc2. Il a été précédemment montré que des animaux déficients en Muc2 étaient plus susceptibles à l'inflammation intestinale et au processus tumoral soulignant l'importance de la couche de mucus dans la réduction de l'adhérence bactérienne aux cellules intestinales. Récemment, une déficience en certains oligosaccharides composant le mucus, ceux présentant une liaison O-glucosidique, a été corrélée à l'apparition d'une colite spontanée chez la souris (163).

Nous pouvons donc résumer les différents acteurs de l'écosystème intestinal pouvant intervenir dans la physiopathologie des MICI par ce schéma (figure 5)

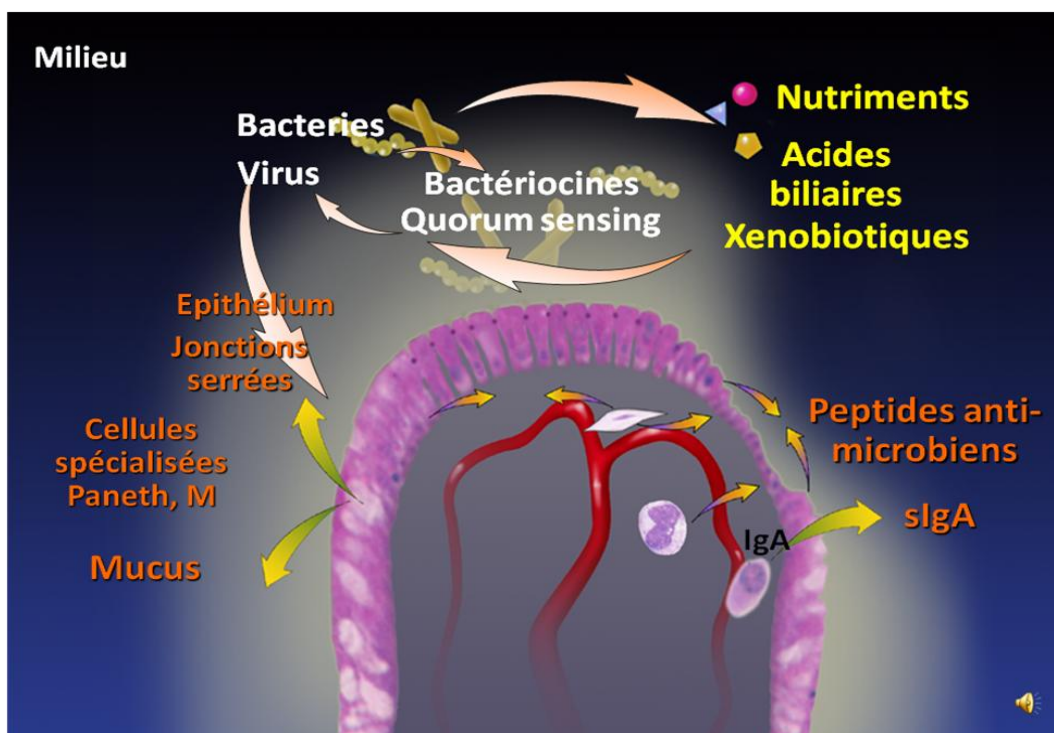


Figure 5 : principaux acteurs de l'écosystème intestinal impliqués au cours des MICI et leurs interactions

IV. Objectifs

Le microbiote intestinal apparaît comme un élément clé dans la physiopathologie des MICI. La dysbiose au cours des MICI est de mieux en mieux caractérisée par le développement et l'utilisation de nouveaux outils. L'ARNr 16S puis les techniques de séquençage avec la mise à disposition de la bioinformatique ont permis le séquençage de tout le génome du microbiote via le projet MetaHIt et nous permet de nouvelles voies d'explorations via la métabolomique. Ces nouvelles données permettent de mieux envisager la dysbiose en elle-même avec la perte de bactéries anti-inflammatoires libérant une niche écologique qui peut-être colonisée, de manière opportuniste, par des bactéries entraînant une pathogénicité de type inflammation chronique. Au-delà de cette action directe, le microbiote s'inscrit dans un écosystème complexe dont le bon fonctionnement permet le maintien de l'homéostasie intestinale. Au cours d'une dysbiose, les modifications du contenu luminal (acides biliaires, PAM, phages, nutriments ...) pourraient participer à la promotion d'une inflammation chronique. Ces modifications de l'écosystème sont autant de pistes pour tenter de restaurer une normobiose. De fait, si l'utilisation des pro- et pré-biotiques dans le champ des MICI reste à ce jour décevante, des perspectives d'approches thérapeutiques médiées par le microbiote restent une voie thérapeutique pertinente. Certaines pistes comme l'implication des acides biliaires nous paraissent essentielles en tant que clinicien, par leur importance au sein du contenu luminal et leur modifications par le microbiote intestinal. L'environnement de recherche se prêtait parfaitement à l'étude de cette piste, au sein d'un hôpital avec un service spécialisé dans la prise en charge des patients atteints de MICI, permettant d'être au contact de nombreux patients ouverts à la recherche, notamment fondamentale. De plus, dans ce même hôpital, la présence d'un service spécialisé dans les maladies biliaires inflammatoires a permis de mettre en œuvre pour la pratique clinique et de recherche, l'analyse des acides biliaires par spectrométrie de masse LC MS/MS. Cet environnement de recherche très favorable a permis de réaliser le deuxième travail de cette thèse portant sur les acides biliaires et leur modification au cours de la dysbiose dans les MICI. D'autres pistes comme la modification des PAM ont déjà été étudiées au cours des MICI par des techniques d'immunohistochimie et de RT PCR sur des prélèvements histologiques. L'environnement de recherche et la présence de patients atteints de MICI et sensibilisés à la recherche, ainsi que la possibilité de réaliser des analyses par LC MS/MS afin de mettre en évidence les PAM dans leur forme active sécrétée plutôt que sous la forme d'ARNm intracellulaire, a permis une exploration différente de cet élément de l'écosystème digestif dans les MICI dans le troisième travail de ma thèse. Enfin, certaines données suggèrent que la dysbiose associée aux MICI pourrait précéder

l'inflammation intestinale. Si l'on considère que le microbiote intestinal est un élément clé dans la régulation de l'inflammation, la dysbiose précédant la rechute pourrait être un outil pronostique potentiel et une cible majeure pour les traitements. L'étude STORI, menée dans le cadre de la recherche clinique, avec la force d'une étude multicentrique prospective dédiée aux marqueurs prédictifs, nous a permis d'explorer, dans la première partie de ma thèse, les valeurs prédictives de la dysbiose dans un contexte clinique.

DEUXIEME PARTIE

Etude STORI : la dysbiose marqueur prédictif de récive

Les MICI touchent environ 1 personne sur 1000 en Europe occidentale et l'incidence est en constante augmentation. La quête de marqueurs cliniques et biologiques apparaît essentielle pour une prise en charge personnalisée du patient. Ces marqueurs nous servent à évaluer les patients nécessitant un traitement intensif d'emblée devant le risque d'évolution péjoratif de la maladie vers la sténose, la perforation, voire le cancer. Les marqueurs nous aident également à prédire à qui peut bénéficier la reprise d'un traitement en post opératoire et enfin à savoir quand arrêter certains traitements afin d'éviter les effets secondaires et les risques inutiles. Ces questions représentent le quotidien des praticiens dans la gestion des patients et apporter des réponses à ces questions permet d'améliorer la prise en charge des patients et la prédiction des récives. Ces marqueurs sont d'une importance essentielle en termes de management thérapeutique. Il paraît important de traiter plus intensément les patients dont la maladie est potentiellement plus sévère mais il est aussi important d'éviter l'administration de traitements inutiles chez d'autres, leurs évitant des effets secondaires potentiellement délétères.

Le microbiote intestinal est un élément clé dans la physiopathologie des MICI. La dysbiose au cours de MICI est de mieux en mieux caractérisée par le développement et l'utilisation de nouveaux outils. Le microbiote intestinal est donc un élément important dans la régulation de l'inflammation, rechercher des facteurs prédictifs dans ce compartiment physiologique qu'est le microbiote intestinal apparaît comme une piste incontournable. L'idée a été de s'insérer dans une étude dédiée aux facteurs prédictifs à l'arrêt d'un immunosuppresseur avec la force d'une étude multicentrique prospective. L'étude STORI, portant sur l'interruption de l'infliximab chez les patients atteints de maladie de Crohn en rémission sous combothérapie avec un autre immunosuppresseur (1), nous a permis d'explorer les valeurs prédictives de la dysbiose dans un contexte clinique.

Cette étude a permis de confirmer que la dysbiose, caractérisée par une diminution des Firmicutes, est un trait caractéristique dans la maladie de Crohn dans une population homogène de patients en rémission. Comme précédemment observé dans un modèle de récive post opératoire de maladie de Crohn (104), la diminution des Firmicutes précède la rechute. Ceci suggère le rôle prééminent du microbiote menant à la rechute (1). Même s'il existe potentiellement une corrélation entre microbiote et inflammation, la corrélation inverse entre *F. prausnitzii* et les taux de CRP et calprotectine fécale n'étaient pas significatifs, peut être par manque de puissance, et devrait être examiné dans une étude dédiée. Il a déjà été montré dans une étude précédente que le faible taux de *F. prausnitzii* était associé à la récurrence endoscopique chez les patients atteints de maladie de

Crohn 6 mois après résection iléale (104) et que les propriétés anti-inflammatoires de cette bactérie étaient impliquées dans son rôle protecteur dans l'homéostasie intestinale. Au cours de ce travail, la dysbiose caractérisée notamment par la diminution de *F. prausnitzii* à T0, était plus prononcée chez les rechuteurs, suggérant qu'un manque de *F. prausnitzii* pourrait être un facteur prédictif de rechute. De plus, l'analyse par la méthode de Kaplan-Meier recherchant les valeurs prédictive de certains groupes bactériens a permis de montrer que le groupe *C. coccoides* et l'espèce *F. prausnitzii* étaient capables de prédire l'histoire naturelle de la maladie de Crohn avec à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Ces résultats encouragent le développement de biomarqueurs basés sur le microbiote intestinal comme nouveaux outils prédictifs. La dysbiose est fortement suspectée de jouer un rôle dans l'initiation et déclenchement de l'inflammation de l'intestin au cours des MICI (86). La perte de bactéries anti-inflammatoires (telle que *F. prausnitzii*) et l'augmentation des bactéries pro-inflammatoires (comme l'AIEC) pourrait déclencher l'inflammation de l'intestin. Ces résultats renforcent l'hypothèse que les changements primitifs du microbiote intestinal influencent les réponses immunitaires intestinales (97, 98, 101, 164, 165). La lumière intestinale reste un écosystème complexe et, par conséquent, les mécanismes inflammatoires indirects induits par la dysbiose doivent également être étudiée.

En résumé, cette étude a permis de confirmer la dysbiose associée à la maladie de Crohn, caractérisée par une diminution des *Firmicutes*. Un déficit en certains groupes bactériens ou espèces, comme *F. prausnitzii*, pourrait être prédictif de rechute et précéder une inflammation locale ou systémique. Ces résultats renforcent le rôle proéminent du microbiote dans l'évolution de la maladie de Crohn et suggèrent que la restauration de la normobiose au cours de la maladie devrait être un nouveau but dans la prise en charge de ces patients. La recherche de nouveaux biomarqueurs basés sur le microbiote intestinal est une piste intéressante pour le développement de nouveaux outils dans la prise de charge des patients atteints de MICI.

Alterations in the Intestinal Microbiome (Dysbiosis) as a Predictor of Relapse After Infliximab Withdrawal in Crohn's Disease

Sylvie Rajca, MD,¹ Virginie Grondin, BS,¹ Edouard Louis, MD, PhD,² Gwenola Vernier-Massouille, MD,³ Jean-Charles Grimaud, MD, PhD,⁴ Yoram Bouhnik, MD, PhD,⁵ David Laharie, MD, PhD,⁶ Jean-Louis Dupas, MD, PhD,⁷ Helene Pillant, MD,⁸ Laurence Picon, MD,⁹ Michel Veyrac, MD,¹⁰ Mathurin Flamant, MD, PhD,¹¹ Guillaume Savoye, PhD,¹² Raymond Jian, MD, PhD,¹³ Martine Devos, MD, PhD,¹⁴ Gilles Paintaud, MD, PhD,¹⁵ Eric Piver, MD, PhD,⁹ Matthieu Allez, MD, PhD,¹⁶ Jean Yves Mary, PhD,¹⁷ Harry Sokol, MD, PhD,¹ Jean-Frederic Colombel, MD, PhD,¹⁸ and Philippe Seksik, MD, PhD¹

Background: Crohn's disease (CD)-associated dysbiosis could predispose patients to relapse. Gut microbiota composition of patients from the prospective cohort study designed to identify predictive factors of clinical relapse after infliximab discontinuation (STORI Study) was investigated to determine the impact of dysbiosis in CD relapse.

Methods: Fecal samples from 33 patients with CD in this cohort were collected at baseline, 2 months, 6 months, and at the end of the follow-up period (19 relapsers and 14 nonrelapsers). Healthy volunteers subjects (n = 29) were used as a control group. The fecal microbiota composition was assessed using quantitative PCR, and comparisons between the patient groups were made at different time points using the Wilcoxon test. The analysis of the time-to-relapse was performed according to the baseline median level of each bacterial signal.

Results: Dysbiosis was observed in patients with CD compared with healthy subjects, and it was characterized by low mean counts of Firmicutes (*Clostridium coccoides* [$P = 0.0003$], *C. leptum* [$P < 0.0001$], and *Faecalibacterium prausnitzii* [$P = 0.003$]). Lower rates of Firmicutes were seen in relapsers compared with nonrelapsers. Moreover, a low rate of *F. prausnitzii* ($P = 0.014$) and a low rate of *Bacteroides* ($P = 0.030$) predicted relapse independently from high C reactive protein level ($P = 0.0001$).

Conclusions: In this work, we report that CD-associated dysbiosis, characterized by a decrease in Firmicutes, correlates with the time-to-relapse after infliximab withdrawal. A deficit in some bacterial groups or species, such as *F. prausnitzii*, may represent a predictive factor for relapse. Restoring normobiosis in CD could be a new goal for optimal CD management.

(*Inflamm Bowel Dis* 2014;20:978–986)

Key Words: microbiota, dysbiosis, Crohn's disease, *Faecalibacterium prausnitzii*, predictors

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.ibdjournal.org).

Received for publication December 31, 2013; Accepted February 25, 2014.

From the ¹Sorbonne Universités - UPMC Univ Paris 06, INSERM ERL 1157, CNRS UMR 7203 LBM and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU I2B), CHU Saint-Antoine, Paris, France; ²Centre Hospitalier Universitaire de Liège, Liège, Belgium; ³Université Lille Nord de France and CHRU Lille, Lille, France; ⁴Hôpital Nord, Centre d'investigation clinique Marseille Nord, Université Méditerranée, Marseille, France; ⁵INSERM U853, Hôpital Beaujon, Université Paris Diderot, Paris, Clichy, France; ⁶Université Bordeaux, Bordeaux, France; ⁷Hôpital Nord, Amiens, France; ⁸Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; ⁹Hôpital Trousseau, Tours, France; ¹⁰Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, France; ¹¹Hôtel Dieu, Nantes, France; ¹²Hôpital Charles Nicolle, Université de Rouen, Rouen, France; ¹³Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; ¹⁴University of Ghent, Ghent, Belgium; ¹⁵Université François Rabelais de Tours, Tours, France; ¹⁶Hôpital Saint-Louis, Université Paris Diderot, Paris, France; ¹⁷INSERM U717, Biostatistics and clinical epidemiology, Université Paris Diderot, Paris, France; and ¹⁸Icahn Medical School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York.

This work has been granted by the Association Francois Aupetit (#21102009).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Reprints: Philippe Seksik, MD, PhD, Service de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital St-Antoine, 184 rue du Faubourg St-Antoine, Paris 75571, France (e-mail: philippe.seksik@sat.aphp.fr).

Copyright © 2014 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1097/MIB.0000000000000036

Published online 30 April 2014.

Evidence from immunologic, microbiologic, and genetic studies implicates abnormal host-microbial interactions in the pathogenesis of Crohn's disease (CD).^{1–5} Dysbiosis, defined as a reduction in bacterial biodiversity that results in fewer bacteria with anti-inflammatory properties and/or more bacteria with proinflammatory properties compared with healthy controls, has been observed in CD.⁶ Several metagenomic-based studies have reported that members of the Bacteroidetes and Firmicutes phyla were reduced in CD.⁷ In contrast, a greater relative abundance in *Enterobacteria*, mostly *Escherichia coli*, was observed.⁸

Among Firmicutes, *Faecalibacterium prausnitzii* has anti-inflammatory properties. Its numbers are reduced in patients with CD, and we previously reported that low counts are associated with an increased risk of postresection recurrence of ileal CD.⁹ The natural history of CD is characterized by poorly predictable phases of quiescence and activity.¹⁰ On an individual scale and in the absence of reliable predictors, optimal medical strategies, such as top-down or step-up management, are still debated. For now, the therapeutic choice is mostly driven by clinical predictive factors.^{11–13} Thus, if one considers gut microbiota as a key feature

that drives inflammation, dysbiosis that precedes relapse could be a major therapeutic target.

The study of microbiota in a well-defined clinical CD models offers an opportunity to improve our knowledge of relapse pathophysiology. This field of study could represent a new source of biomarkers. Indeed, new predictive tools are needed to create the best therapeutic regimen for CD management. For example, early and prolonged use of anti-TNF medications, such as infliximab, is more frequently advised and questions about when to stop treatment with infliximab in patients with long-standing remission are highly debated.^{14,15} The STORI study (a study of infliximab discontinuation in patients with CD in stable remission on combined therapy with immunosuppressants) gave us the opportunity to explore the predictive value of dysbiosis in another clinical setting. STORI aimed to assess the risk of relapse after infliximab discontinuation and to identify factors associated with a low risk for relapse.¹⁶ Patients with CD who were treated for at least 1 year with scheduled infliximab combined with an antimetabolite and who had corticosteroid-free remission for at least 6 months were prospectively recruited. The antimetabolite was kept at a stable dose over the study period. The goal was then to study the association between CD-associated dysbiosis and risk of CD relapse in these patients.

PATIENTS AND METHODS

STORI Study

Briefly, as previously described, this prospective multicenter cohort study was designed to determine the risks for relapse after infliximab discontinuation in patients on combined maintenance therapy with antimetabolites.¹⁶ On entry into the study, patients with CD had been treated for at least 1 year with scheduled infliximab combined with an antimetabolite, and these patients had been in corticosteroid-free remission for at least 6 months.

Patient Selection

A subgroup of 33 patients with CD from the STORI trial with fecal samples was selected as follows: (1) patients who underwent clinical relapse (relapsers) and had available fecal sampling at baseline, at least one time point in the study period and at the time of relapse were involved in the study ($n = 19$) and (2) patients who remained in remission (nonrelapsers) and had available fecal sampling at baseline, at least one time point in the study period and at the end of follow-up were randomly selected 1 of 2 to form the nonrelapser group ($n = 14$). The relapsers were defined as having clinical relapse after infliximab discontinuation during the study period. A relapse was defined as a Crohn's Disease Activity Index above 250 points or between 150 points and 250 points with a 70-point increase from baseline over 2 consecutive weeks. The nonrelapsers were patients without relapse throughout the study period. A group of 29 healthy volunteer subjects (HS) (11 males; median age, 33 yr; interquartile

range, 24–47) recruited from students of Paris VI medical school and from the research lab INSERM U1057, formed the control group. Exclusion criteria for this group were known chronic disease, any digestive chronic symptoms and/or medication or antibiotic intake at least 3 months before sampling.

Fecal Sampling

The patients were prospectively included and followed-up every 2 months from the time of the last infliximab infusion (baseline). Stool samples were harvested for microbiologic assessment at baseline, 2 months, 6 months, and at the end of the follow-up period (Fig. 1). The samples were stored at -80°C until DNA extraction.

Bacterial Quantification

DNA was extracted from 200-mg aliquots of feces as described previously.^{17,18} Real-time qPCR was performed using an ABI 7000 Sequence Detection System apparatus with system software version 1.2.3 (Applied Biosystems, Life Technology, Saint-Aubin, France).^{17,19} The total numbers of bacteria were inferred from averaged standard curves as described by Lyons et al.²⁰ SYBR-Green qPCR was adapted to quantify the total bacterial populations in addition to the dominant bacterial groups *Clostridium coccoides*, *C. leptum*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, and *Bifidobacterium*. Quantification of the *E. coli* and *F. prausnitzii* bacterial species was also performed. The primers and probes used in this study were designed based on 16S rRNA sequences.^{17–19,21,22} To account for the differences in the quality of the content between the fecal samples, the data for each fecal sample

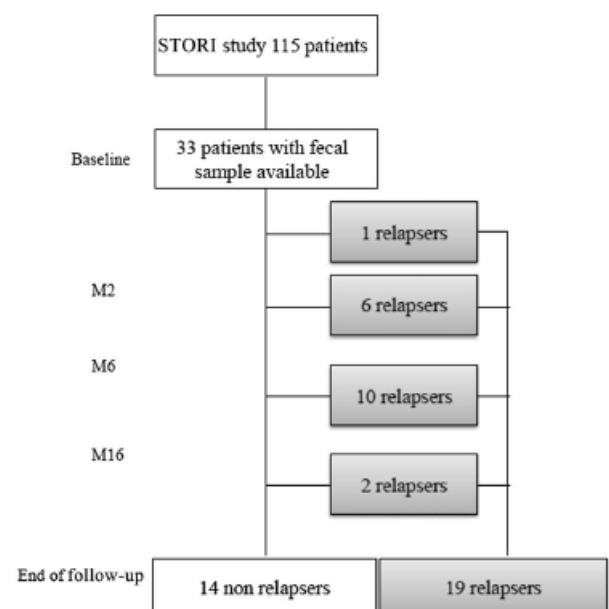


FIGURE 1. Study sampling protocol.

were normalized to all bacteria data.²³ For the all bacteria results obtained by qPCR (all bacteria signal), values were expressed as the mean of the logarithmic (\log_{10}) values \pm SD. For the other probes, results obtained by qPCR (specific bacterial signal) were expressed as a mean of the normalized \log_{10} value \pm SD minus the \log_{10} number of all bacteria signal.¹⁹

Statistical Analysis

The patient characteristics were compared between the relapsers and nonrelapsers at baseline using the chi-square test or Wilcoxon test, when appropriate. The bacterial composition was first compared between the HS and patients with CD at baseline. Then, the bacterial composition was compared within the relapser and nonrelapser groups of patients with CD at baseline and at different time points when available. For the comparisons, the nonparametric Wilcoxon test was performed using JMP software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). To estimate the temporal evolution of dysbiosis, we compared the bacterial compositions between the defined time points (end of follow-up and 6 mo into the follow-up period) and the preceding available time point using a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

To investigate whether dysbiosis could precede inflammation, we searched for correlations between values of each bacterial group at a defined time point and values of biomarkers (C reactive protein [CRP] and fecal calprotectin) from the ensuing time points using Spearman's test.

Finally, to estimate the relapse predictive value of dysbiosis, bacterial signals (all bacteria signal and specific ones) were dichotomized at baseline according to the median value of their

distribution, defining low rate below the median and high rate at or above the median value. Then, patients were classified according to these cutoffs. For the other variables such as CRP, calprotectin, and hemoglobin, dichotomization was done using the same cutoffs than in the princeps STORI study.¹⁶ In case of significant association with relapse occurrence as tested through chi-square method, sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios were calculated. To identify the factors associated with time-to-relapse, the following variables at baseline, calprotectin and CRP level, hemoglobin rate, Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity, and bacterial signals were first studied one by one after dichotomization using Kaplan-Meier method and the log-rank test. To determine independent factors related to time-to-relapse, proportional hazards regression model was used with forward selection, limiting the selection to at most 3 variables in relation to small sample size (P value less than 0.20 for the univariate analyses). Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

RESULTS

CD Patient Characteristics

The demographic, clinical, biological, and endoscopic characteristics of the 33 patients with CD (19 relapsers and 14 nonrelapsers) at baseline are summarized in Table 1. Comparisons between relapsers and nonrelapsers did not show any significant differences at baseline. The characteristics of our subgroup were closed to the entire STORI cohort.

TABLE 1. Characteristics of Patients with CD at Baseline

	All Patients with CD (n = 33)	Non-Relapsers (n = 14)	Relapsers (n = 19)	P
Demographic and clinical characteristics				
Age, yr	33 (26–38)	32 (29–37)	34 (25–39)	0.9
Male, n (%)	13 (39.4)	4 (28.5)	9 (47.4)	0.3
Disease site				
Ileal, n (%)	2 (6)	0 (0)	2 (11)	0.2
Ileocolonic, n (%)	18 (55)	8 (57)	10 (53)	0.8
Colonic, n (%)	13 (39)	6 (43)	7 (37)	0.7
Active smoker, n (%)	12 (36)	5 (36)	7 (37)	0.9
Disease duration, yr	6	5	8	0.4
Biological variables				
Hemoglobin level, g/dL	13.2 (12.5–13.8)	13.1 (12.9–14.8)	13.3 (12.5–13.8)	0.7
Leukocyte count, $10^9/L$	5.9 (4.5–7.2)	6.1 (5.5–9.4)	5.7 (4.4–6.5)	0.2
CRP, mg/L	2.2 (0.5–5.5)	2.1 (0.5–3.3)	3 (0.5–9)	0.5
Fecal calprotectin, $\mu g/g$	54 (32–561)	36 (30–91)	117 (38–683)	0.06
Endoscopy				
Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity	1 (0–2.4)	1 (0–2)	0 (0–2.6)	0.9

Quantitative variables are given as median values with interquartile range (IQR) and qualitative variables are given as numbers (percentage).

TABLE 2. Comparison Between Healthy Subjects and Patients with CD at Baseline According to Their Status (Relapsers and Non-Relapsers) of Bacterial Quantification of Fecal Microbiota

	HS (n = 29)	CD at Baseline (n = 33)	P	Relapsers at Baseline (n = 19)	P	Non Relapsers at Baseline (n = 14)	P
All bacteria	11.7 (11.5 to 11.8)	11.7 (11.3 to 11.9)	0.9	11.5	0.3	11.7	0.4
<i>Bacteroides</i>	-1.1 (-1.3 to -0.9)	-1.0 (-1.3 to -0.8)	0.4	-1.1	0.2	-0.7 ^a	0.006
<i>C. coccoides</i>	-0.7 (-0.8 to -0.5)	-1.3 (-2.0 to -1.1) ^a	0.0003	-1.9 ^a	<0.0001	-0.9	0.3
<i>Bifidobacteria</i>	-2.6 (-2.9 to -2.5)	-2.9 (-3.3 to -2.2)	0.5	-2.7	0.6	-2.7	0.8
<i>Lactobacillus</i>	-4.0 (-4.2 to -3.7)	-4.1 (-4.3 to -3.5)	0.9	-3.6	0.8	-4.5	0.3
<i>C. leptum</i>	-1.7 (-1.7 to -1.7)	-2.6 (-3.6 to -2.4) ^a	<0.0001	-2.4 ^a	<0.0001	-2.4 ^a	<0.0001
<i>F. prausnitzii</i>	-1.4 (-1.6 to -1.1)	-2.5 (-2.8 to -1.4) ^a	0.003	-2.5 ^a	<0.0001	-1.1	0.6
<i>E. coli</i>	-3.9 (-4.5 to -3.7)	-3.5 (-4.1 to -3.2)	0.09	-3.2	0.3	-3.5	0.08

^aResults are given as median with IQR for healthy subjects and patients with CD, as median for relapsers and nonrelapser patients with CD. Significant difference from healthy subjects for total CD, relapsers, and nonrelapsers ($P < 0.05$).

Fecal Bacterial Composition According to Phenotype

The bacterial quantifications (bacterial signals) of the HS and patients with CD are given in Table 2. The total count of

bacteria (all bacteria signal) was similar at baseline between the HS and CD groups. Lower counts in Firmicutes (*C. coccoides*, $P = 0.0003$; *C. leptum*, $P < 0.0001$; and *F. prausnitzii*, $P = 0.003$) were observed in the patients with CD at baseline. A trend

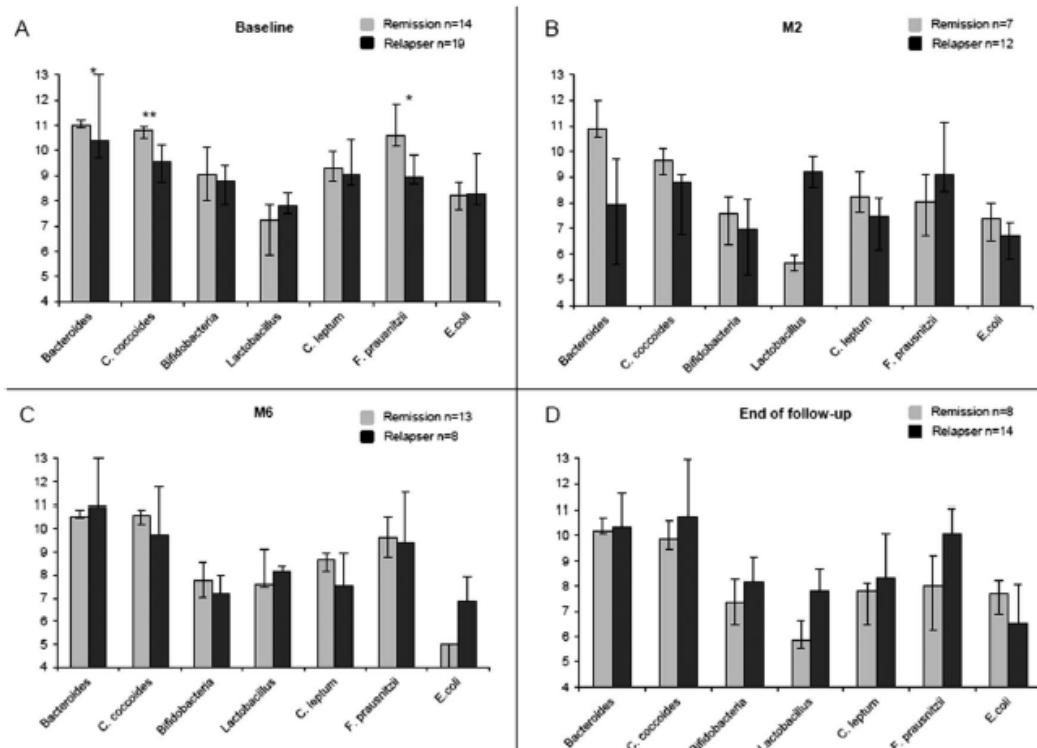


FIGURE 2. Bacterial fecal composition between relapser (black bar) and nonrelapser (gray bar) patients with CD at baseline (A), M2 (B), M6 (C), and at the end of the follow-up period (D). The results obtained by qPCR were expressed as the median of the log₁₀ value with interquartile range. * $P = 0.02$, ** $P = 0.006$.

TABLE 3. Sensitivity (Se), Specificity (Sp), Positive (PLR) and Negative Likelihood Ratio (NLR) Estimates (95% Confidence Interval) of Bacterial Counts at Baseline Related to Relapse Occurrence

	Se	Sp	PLR	NLR
<i>F. prausnitzii</i>	0.69 (0.60–0.78)	0.82 (0.74–0.89)	3.8 (3.2–4.4)	0.4 (0.3–0.5)
<i>C. coccoides</i>	0.72 (0.64–0.80)	0.86 (0.80–0.91)	5.1 (4.3–5.9)	0.3 (0.2–0.4)
<i>Bacteroides</i>	0.72 (0.64–0.80)	0.79 (0.71–0.86)	3.4 (2.9–3.9)	0.4 (0.3–0.4)

towards higher counts in *E. coli* was also observed in patients with CD at baseline. Moreover, dysbiosis was observed between HS and CD nonrelapsers and between HS and CD relapsers.

The bacterial quantification values in the 2 groups of patients with CD (relapsers and nonrelapsers) are given in Figure 2A. At baseline, the counts in *C. coccoides* ($P = 0.006$), *F. prausnitzii* ($P = 0.02$), and *Bacteroides* ($P = 0.02$) were lower in relapsers, giving a picture of a deeper dysbiosis in relapsers.

Fecal Bacterial Composition in Patients with CD over Time

Each bacterial group at defined time points (at the end of the follow-up and 6 mo into follow-up period) and the preceding available time point were compared (see Table, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/IBD/A459>). In relapsers, there was no difference in fecal bacterial composition between these samples. Similarly, in nonrelapsers, fecal microbiota composition was relatively stable over time. At most, a slight decrease in the *E. coli* signal was observed at 6 months when compared

with the preceding time point (see Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/IBD/A460>).

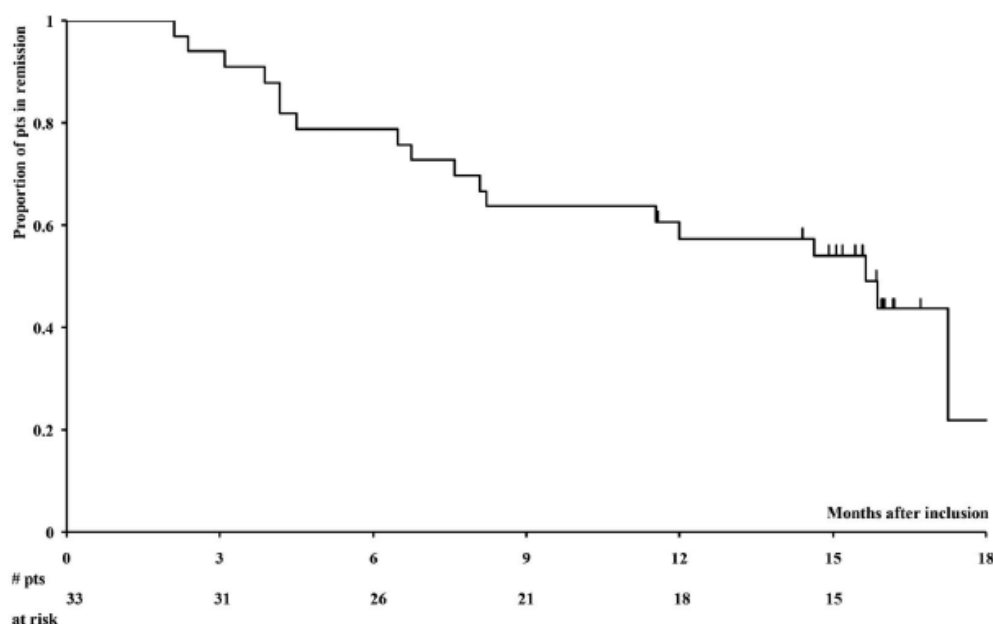
Correlations with Biological Markers

Correlations between bacterial signals and biological markers at the same time points (baseline, M2, and M6) or at different time points (between one time point for bacterial and the ensuing time point for biological markers) did not show significant associations ($P > 0.45$).

Dysbiosis as a Predictive Factor of Relapse

Dysbiosis signals associated with relapse occurrence were low levels (below the median) of *Bacteroides* ($P = 0.004$), *F. prausnitzii* ($P = 0.010$), and *C. coccoides* ($P = 0.0004$). Sensitivity, specificity, the positive and negative likelihood ratios of bacterial counts at baseline significantly related to relapse occurrence are given in Table 3.

In the total cohort of patients with CD ($n = 33$), relapse after infliximab withdrawal occurred in $42.6\% \pm 8.6\%$ at 1 year

**FIGURE 3.** Kaplan-Meier time-to-relapse curve of the 33 patients included. There were 19 patients with confirmed relapse.

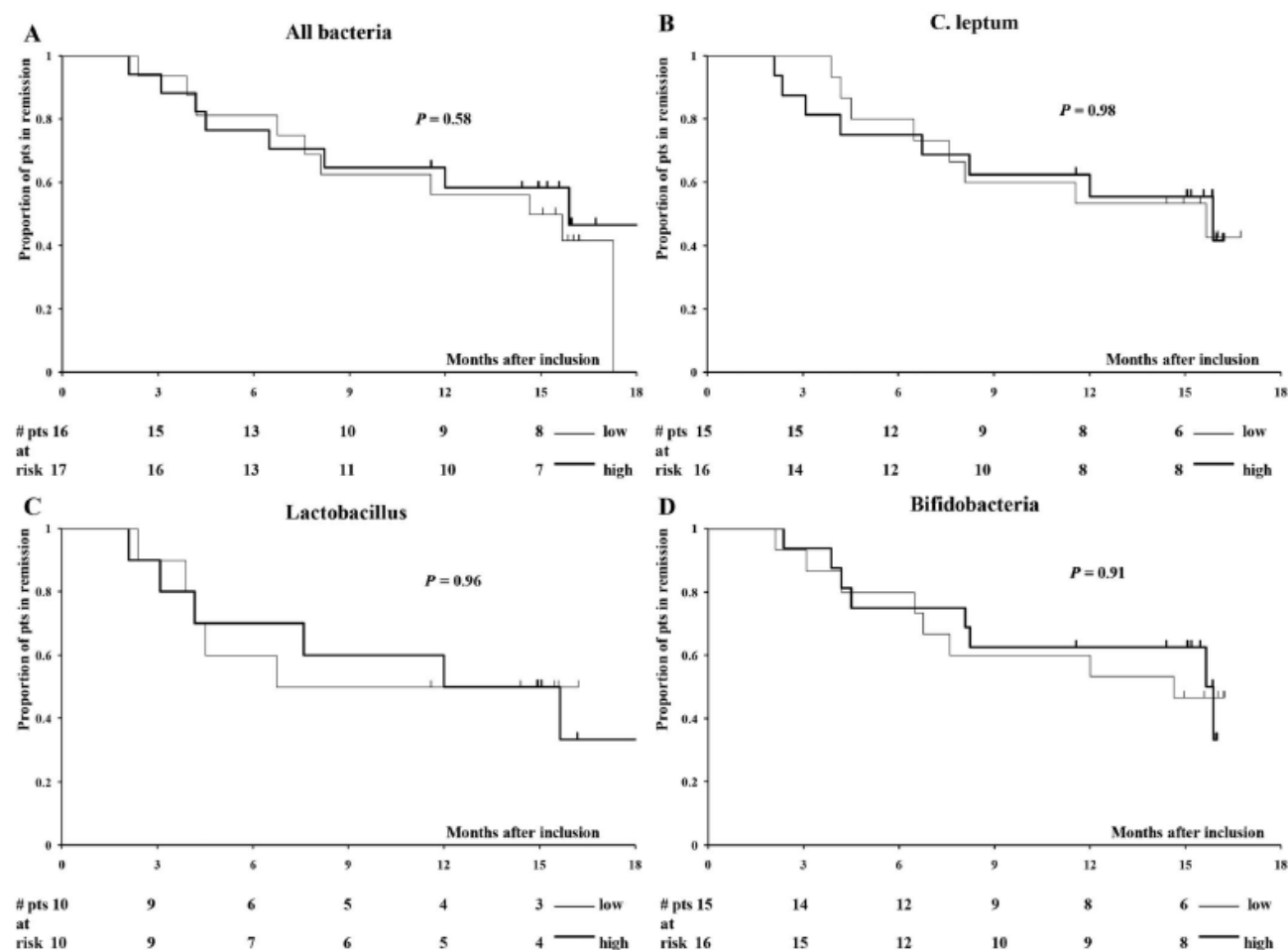


FIGURE 4. Kaplan-Meier time-to-relapse curves using bacterial signals [all bacteria (A), *C. leptum* (B), *Lactobacillus* (C), and *Bifidobacteria* (D)] dichotomized at baseline according to the median value as predictive markers. The bold curve represents a high rate of bacteria above the median value of bacterial signal. The standard curve represents a low rate of bacteria below the median value of bacterial signal.

(Fig. 3). The association of clinical, biological variables, bacterial signals with time-to-relapse is described in Table, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/IBD/A461> and in Figures 4 and 5 for the latter. We observed that all bacterial signals at baseline were not predictive of relapse (Fig. 4A) were not *C. leptum*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* (Fig. 4B–D). *Bacteroides* signal was borderline not significantly related to time-to-relapse ($P = 0.06$, Fig. 5B). Interestingly, low rate of *F. prausnitzii* (below the median) at baseline could differentiate nonrelapsers and relapsers ($P = 0.04$, Fig. 5A). The same was true for *C. coccoides* ($P = 0.009$, Fig. 5C). The results of the univariate analyses using a proportional hazard regression model are given in Table, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/IBD/A461>. As shown in Table, Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/IBD/A462>, factors independently associated with time-to-relapse were a high CRP level ($P = 0.0001$), a low rate of *F. prausnitzii* count ($P = 0.014$), and a low rate of *Bacteroides* ($P = 0.030$).

DISCUSSION

In this study, we confirmed that dysbiosis is a key feature of CD in a homogenous population of patients with CD in remission. Dysbiosis was characterized by a decrease in the Firmicutes and *F. prausnitzii* counts. Furthermore, our results support that low rates of some members of the Firmicutes in patients with CD in remission could be predictive of relapse. This has been clearly showed for *F. prausnitzii* count in a CD postoperative recurrence model.⁹ This suggests the prominent role of microbiota as a primary phenomenon in CD relapse.¹⁶

In recent years, our group has aimed to clearly describe dysbiosis in patients with CD. Our data show decreased *C. leptum*, a species within the Firmicutes bacterial phyla.⁷ *F. prausnitzii* is the major constituent of the *C. leptum* group and has been identified as an anti-inflammatory commensal bacterium.⁹ In this study, we confirmed that dysbiosis is centered on a decrease in Firmicutes in patients with CD compared with HS. We were not

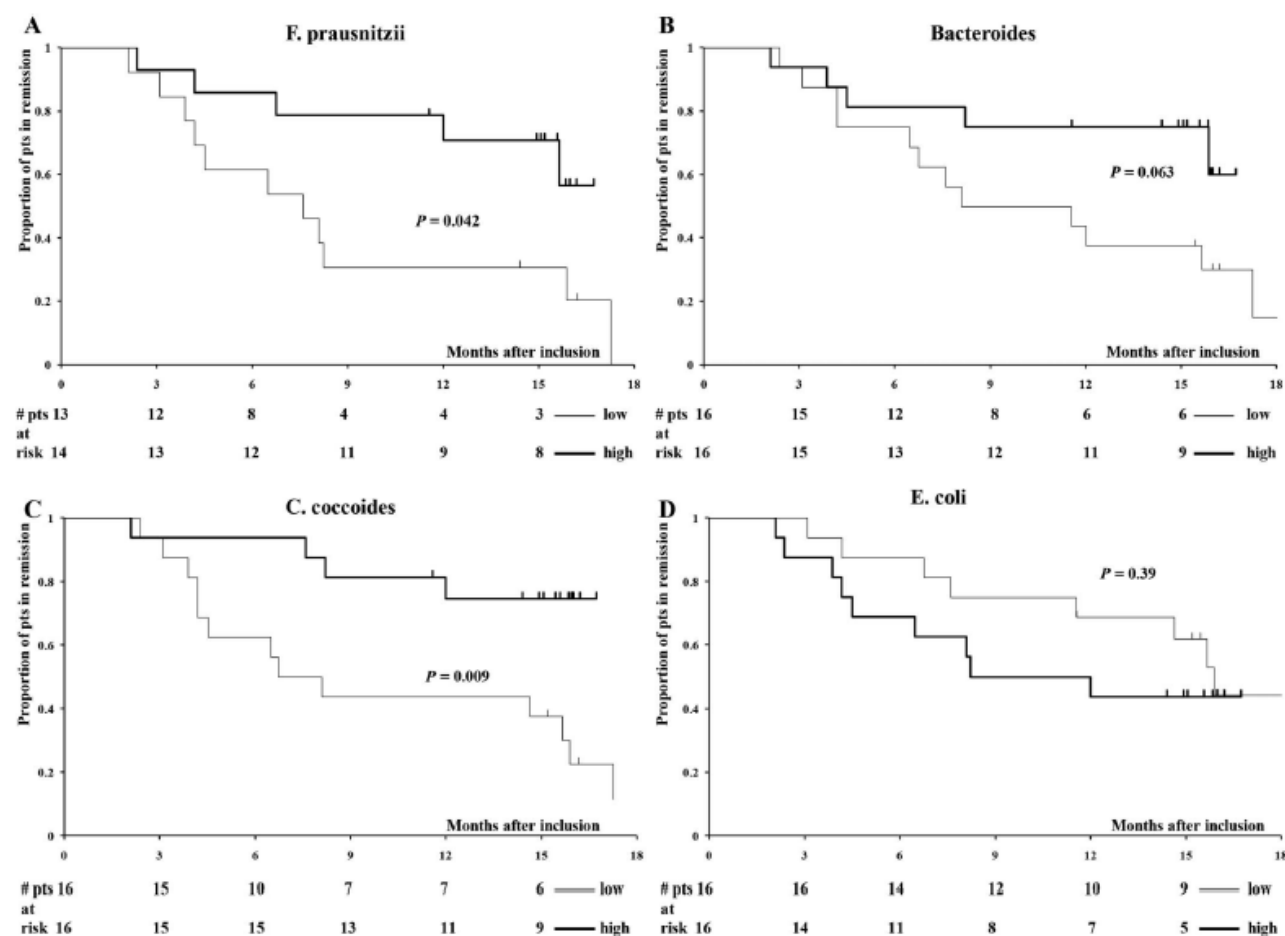


FIGURE 5. Kaplan–Meier time-to-relapse curves using bacterial signals [*F. Prausnitzii* (A), *Bacteroides* (B), *C. coccoides* (C), and *E. coli* (D)] dichotomized at baseline according to the median value as predictive markers. The bold curve represents a high rate of bacteria above the median value of bacterial signal. The standard curve represents a low rate of bacteria below the median value of bacterial signal.

able to extend microbiota analysis to the entire population in the STORI trial because of a lack of samples. Thus, we limited this work to a subgroup of patients. However, in looking at this subgroup of patients, their characteristics seem to be similar to those in the STORI trial. Still, the census was small, and all the patients were well phenotyped. Furthermore, the Kaplan–Meier time-to-relapse curve seems to be similar to the STORI trial curve.¹⁶ Thus, information gathered from this subgroup seems valid.

On deciding to perform an exploratory study, we also decided to focus our bacterial analysis on fecal compartment composition for feasibility reasons because of the multicentric features of the study setting. We thus could not investigate mucosa-associated bacteria. However, the fecal microbiota remains informative for analysis of the community structure.²⁴ Technically, we feel confident in our bacterial results. In fact, although the sampling was performed in 20 centers in France and Belgium (data not shown), the total bacterial count of each sample did not differ from the controls sampled in a single center

(St. Antoine Hospital, Paris, France). This indicates that the quality of sample conservation from collection to shipment to the centralized laboratory was adequate. Notably, for all samples, DNA extraction and analysis were centralized. The techniques used in this work (quantitative PCR) were able to identify major differences in the microbiota community structure. It revealed differences between relapsers and nonrelapsers at baseline and slight changes in each group over time. This suggests that microbiota structure analysis can differentiate 2 populations of patients who will evolve within 1 year either towards relapse or to stable remission. We know that within bacterial groups and species, our techniques did not allow discrimination of particular pathogens, such as adherent–invasive *E. coli*, which has been specifically associated with the ileal mucosa of patients with CD.⁸ However, because some bacterial groups remained stable over time, especially the total number of bacteria, we feel confident in the relevant changes in bacterial groups observed in our study.

On observation of the correlation between microbiota and inflammation, we failed to show that *F. prausnitzii* was inversely correlated with both CRP and fecal calprotectin levels. The identification of a link between the severity of dysbiosis and severity of inflammation remains a challenging topic. In this work, dysbiosis, characterized by notably decreased *F. prausnitzii* at baseline, was more severe in the relapsers suggesting that a lack in *F. prausnitzii* could be a predictive factor of relapse. When looking at our result of bacterial fecal composition between relapsers and nonrelapsers at M2 and/or M6, significance for *F. prausnitzii* and *Bacteroides* completely disappears. To note, at M2, a lot of patients were not sampled. However, this does not rule out the effect observed with baseline comparisons. Besides, a good predictive value of relapse was found for *F. prausnitzii* with good sensitivity and specificity. Furthermore, a log-rank analysis assessing the predictive value of some bacterial groups showed that the *C. coccoides* bacterial group and *F. prausnitzii* species were able to predict CD relapse. One can argue that dysbiosis could seem as a surrogate for smoldering inflammation and incomplete disease control and one could speculate that in inflammatory bowel disease, dysbiosis precedes gut inflammation. It has been previously shown that lower rates of *F. prausnitzii* are associated with endoscopic recurrence in patients with CD 6 months after ileal resection,⁹ and that the anti-inflammatory properties of this bacterium involve a protective role for *F. prausnitzii* in gut homeostasis.

These results encourage the search of biomarkers based on gut microbiota as new predictive tools. Indeed, the intestinal microbiota plays a crucial role in host physiology. Dysbiosis is thus strongly suspected to play a role in initiating and triggering gut inflammation in inflammatory bowel disease.²⁵ In our study, CD-associated dysbiosis is already present at baseline, and some groups and species are clearly associated with the onset of gut inflammation. The loss of anti-inflammatory bacteria (such as *F. prausnitzii*) and increased proinflammatory bacteria (such as adherent-invasive *E. coli*) could trigger gut inflammation. These results reinforce the hypothesis that changes in the primary gut microbiota influence gut immune responses.^{26–30} The gut lumen remains a complex ecosystem, and thus, indirect inflammatory mechanisms induced by dysbiosis must also be investigated. Because the gut microbiota is involved in antimicrobial peptide secretion,^{31,32} bile acid metabolism,^{33–35} mucus glycosylation,^{36,37} and quorum sensing cross-talk,³⁸ dysbiosis may lead to an ecological change that can precipitate gut inflammation. In this setting, our results have prompted us to assess the benefit of restoring normobiosis in CD management.

In summary, we confirmed that CD-associated dysbiosis is characterized by a decrease in Firmicutes and is associated with a decreased time-to-relapse. More precisely, we showed that a deficit in *F. prausnitzii* is predictive of CD relapse in patients in remission as it has been showed previously in a CD postoperative recurrence model. Our results reinforce the prominent role of microbiota in CD outcomes and suggest that restoring normobiosis in CD could be new goal of CD management.

ACKNOWLEDGMENTS

The following GETAID Centers (investigators) participated in this study: Amiens (J. L. Dupas), Bordeaux (D. Laharie), Caen (J. M. Reimund), Clichy-Beaujon (Y. Bouhnik), Colombes-L. Mourier (P. Jouet), Gent (M. De Vos), Liège (J. Belaiche, E. Louis), Lille (J.-F. Colombel, G. Vernier-Massouille), Lyon (S. Nancey), Marseille (J. C. Grimaud), Montpellier (M. Veyrac), Nantes (A. Boureille, M. Flamant), Paris-HEGP (R. Jian); Paris-Lariboisière (P. Marteau), Paris-St Louis (M. Lemann, M. Allez), Rouen, (G. Savoye), Strasbourg (B. Duclos), and Tours (L. Picon).

REFERENCES

- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411:599–603.
- Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004;126:1620–1633.
- MacDermott RP. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 1996;31:907–916.
- Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:666–676.
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307–317.
- Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:106–111.
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1183–1189.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412–421.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:16731–16736.
- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140:1785–1794.
- Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, et al. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2006;130:650–656.
- Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut*. 2005;54:364–368.
- Lewis JD. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1817–1826 e2.
- Ljung T, Karlen P, Schmidt D, et al. Infliximab in inflammatory bowel disease: clinical outcome in a population based cohort from Stockholm County. *Gut*. 2004;53:849–853.
- Kiss LS, Szamosi T, Molnar T, et al. Early clinical remission and normalization of CRP are the strongest predictors of efficacy, mucosal healing and dose escalation during the first year of adalimumab therapy in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34:911–922.
- Louis E, Mary JY, Vernier-Massouille G, et al. Maintenance of remission among patients with Crohn's disease on antimetabolite therapy after infliximab therapy is stopped. *Gastroenterology*. 2012;142:63–70 e5.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009;9:123.
- Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:4605–4614.
- Furet JP, Firmesse O, Gourmelon M, et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;68:351–362.
- Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2362–2365.
- Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, et al. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4423–4427.

22. Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, et al. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:32–39.
23. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thomaval F, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One*. 2011;6:e16393.
24. Sokol H, Lay C, Seksik P, et al. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:858–867.
25. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55:205–211.
26. Chow J, Tang H, Mazmanian SK. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol*. 2011;23:473–480.
27. Kelly D, Mulder IE. Microbiome and immunological interactions. *Nutr Rev*. 2012;70(suppl 1):S18–S30.
28. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011;331:337–341.
29. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*. 2009;31:677–689.
30. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139:485–498.
31. Gersemann M, Wehkamp J, Stange EF. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 2012;271:421–428.
32. Frantz AL, Rogier EW, Weber CR, et al. Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol*. 2012;5:501–512.
33. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006;47:241–259.
34. Batta AK, Salen G, Arora R, et al. Side chain conjugation prevents bacterial 7-dehydroxylation of bile acids. *J Biol Chem*. 1990;265:10925–10928.
35. Duboc H, Rajca S, Rainteau D, et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2012;62:531–539.
36. Varyukhina S, Freitas M, Bardin S, et al. Glycan-modifying bacteria-derived soluble factors from *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus casei* inhibit rotavirus infection in human intestinal cells. *Microbes Infect*. 2012;14:273–278.
37. Fu J, Wei B, Wen T, et al. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:1657–1666.
38. Jacobi CA, Grundle S, Hsieh CJ, et al. Quorum sensing in the probiotic bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor)—evidence that furanose borate diester (AI-2) is influencing the cytokine expression in the DSS colitis mouse model. *Gut Pathog*. 2012;4:8.

Les acides biliaires : conséquences au cours de la dysbiose

Un des éléments les plus dépendants du microbiote est le pool d'acides biliaires luminal. Au-delà des effets directs du microbiote sur l'hôte, si l'on s'intéresse au rôle fonctionnel indirect du microbiote, la prise en compte du pool luminal d'acide biliaire est l'une des premières pistes à envisager. Dans la lumière Intestinale, des réactions enzymatiques réalisées par certaines bactéries intestinales sont responsables de la biotransformation des acides biliaires. Compte tenu de cette place centrale du microbiote dans le cycle entéro-hépatique des acides biliaires (119), la dysbiose associée aux MICI pourrait induire un dysmétabolisme des acides biliaires et affecter l'homéostasie intestinale. Ainsi, nous avons souhaité mesurer les acides biliaires sériques et fécaux et caractériser le microbiote intestinal des patients.

Dans cette étude, nous avons pu démontrer que la dysbiose au cours des MICI conduisait à un dysmétabolisme des acides biliaires caractérisé par un défaut de déconjugaison, de transformation et de désulfatation. De plus, nous avons démontré que ce dysmétabolisme associé aux MICI dans la lumière intestinale pourrait potentialiser la réponse épithéliale inflammatoire et aggraver la maladie. Afin de créer un groupe homogène de patients, les patients ayant des anomalies des tests hépatiques ou une pathologie hépatique étaient exclus afin de s'affranchir des perturbations basales de la biosynthèse des acides biliaires (166, 167). L'iléon terminal étant un site majeur de la réabsorption des acides biliaires (168-170), les patients atteints de maladie de Crohn avec atteinte iléale ont également été exclus. La recherche systématique d'une malabsorption des acides biliaires aurait été intéressante mais ni la scintigraphie ni les tests sanguins appropriés n'étaient disponibles en France. La déconjugaison et la déshydroxylation des acides biliaires sont strictement dépendants de l'activité du microbiote intestinal. Une diminution des bactéries portant l'activité Bile Salt Hydrolase (BSH) pourrait être impliquée dans l'augmentation des acides biliaires conjugués contenu dans les selles. Bien que l'on ne puisse pas exclure le rôle de la diminution globale du microbiote intestinal, nos résultats indiquent clairement que la dysbiose est principalement due à un manque de *Firmicutes*. Parmi l'ensemble des bactéries intestinales, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont les bactéries ayant l'activité de déconjugaison la plus importante (171, 172). Par conséquent, un déficit en acides biliaires non conjugués et secondaires pourrait être considéré comme un marqueur de la dysbiose associée aux MICI. Malgré une redondance enzymatique de la déconjugaison des acides biliaires, la mesure de l'activité métabolique des échantillons fécaux des patients atteints de MICI a

montré un dysfonctionnement de cette activité, particulièrement au cours des poussées. *In vivo*, la transformation des acides biliaires des patients atteints de MICI dépend des nombreuses souches bactériennes (173), et la déconjugaison représente une étape limitante de la voie de biotransformation des acides biliaires (117, 174). L'expérience sur les souris axéniques a permis de mettre en évidence des pertes de fonctions observées chez les patients atteints de MICI, confirmant une augmentation des acides biliaires primaires, conjugués et sulfatés. La lumière intestinale est une source d'acides biliaires 3-OH-sulfatés (175, 176), basée sur un équilibre entre la sulfatation des acides biliaires par la paroi intestinale d'une part, et la désulfatation par le microbiote de l'autre. L'analyse de l'activité sulfatase a révélé cette baisse d'activité dans les selles des patients atteints de MICI. La forte proportion d'acides biliaires 3-OH-sulfatés dans les matières fécales chez la souris axénique soutient l'idée de la genèse des acides biliaires 3-OH-sulfaté par la paroi intestinale, avec une expression intestinale de la sulfo-transférases dans les cellules intestinales humaines (175, 177). Ainsi, la combinaison de dysbiose et du dysmétabolisme des acides biliaires suggère une perte de fonction du microbiote dans les MICI. Des mécanismes indirects peuvent également être impliqués. Les bactéries intestinales pourraient moduler l'activité sulfo-transférase intestinale (sulfatation des acides biliaires) à travers des modulines qui interfèrent au niveau local avec les voies de signalisation des cellules épithéliales iléales ou des colonocytes (178), ou déclencher la biosynthèse globale des acides biliaires, en particulier les acides biliaires 3-OH-sulfaté, grâce à la régulation des récepteurs nucléaires, tels que FXR exprimés dans les cellules épithéliales de l'iléon (179). Les propriétés anti-inflammatoires des acides biliaires secondaires ont été décrits sur la base du constat que la cholestase chronique était associée à une immunosuppression, avec une inhibition de la sécrétion de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ et d'IL-6 par les macrophages sous l'effet des acides biliaires (125, 180). Les expériences *in vitro* confirment que les acides biliaires secondaires (LCA et DCA) peuvent exercer des effets anti-inflammatoires dans les cellules épithéliales du côlon humain indépendamment de tout effet cytotoxique des acides biliaires sur ces cellules. Fait intéressant, cet effet a été perdu après sulfatation (Figure 6).

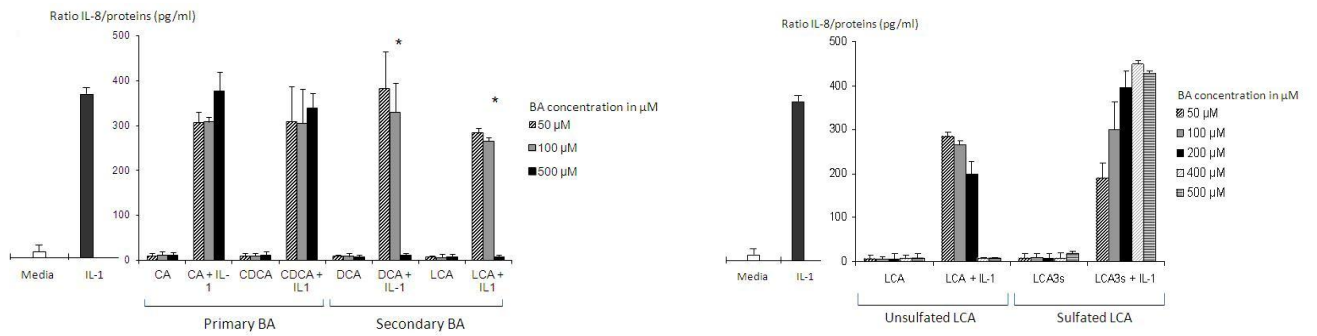


Figure 6 : sécrétion d'interleukine (IL) 8 par les cellules Caco-2 après stimulation par l'IL-1b, mesurée par ELISA : (A) contact avec des acides biliaries primaires (CA et CDCA) et secondaires (DCA et LCA) ; (B) contact avec des acides biliaries secondaires sulfatés (LCA 3S) et non sulfatés (LCA). Les valeurs sont indiquées par un rapport IL-8/protéines total (pg/mL) dans le milieu après 6h.

En résumé, l'altération de l'activité enzymatique du microbiote observée au cours de la dysbiose associée aux MICI entraîne des modifications dans la composition du pool d'acides biliaries luminal. La modification de la transformation des acides biliaries dans la lumière intestinale pourrait affecter les effets anti-inflammatoires de certains acides biliaries sur les cellules épithéliales intestinales et pourrait participer à l'inflammation chronique des MICI. Une étude plus approfondie sur les voies de signalisations affectées par la dysmétabolose des acides biliaries permettrait de mieux comprendre la physiopathologie des MICI.

ORIGINAL ARTICLE

Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases

Henri Duboc,^{1,2,3} Sylvie Rajca,^{1,2,3} Dominique Rainteau,^{1,2,4} David Benarous,⁵ Marie-Anne Maubert,^{1,2,4} Elodie Quervain,^{1,2} Ginette Thomas,^{1,2,4} Véronique Barbu,⁴ Lydie Humbert,^{1,2,4} Guillaume Despras,² Chantal Bridonneau,⁶ Fabien Dumetz,⁶ Jean-Pierre Grill,^{1,2} Joëlle Masliah,^{1,2,4} Laurent Beaugerie,^{1,2,3} Jacques Cosnes,^{1,2,3} Olivier Chazouillères,⁷ Raoul Poupon,⁷ Claude Wolf,¹ Jean-Maurice Mallet,² Philippe Langella,⁶ Germain Trugnan,^{1,2,4} Harry Sokol,^{1,2,3} Philippe Seksik^{1,2,3}

► Additional data are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302578>)

¹INSERM ERL U 1057, UMR 7203, Paris, France

²UMR 7203 Laboratoire des Biomolécules, Ecole Normale Supérieure, Paris, France

³Département de Gastro-entérologie et Nutrition, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France

⁴Département de Biochimie B et LCBGM, Hôpital Saint Antoine AP-HP, Paris, France

⁵Mu-Tis, Paris, France

⁶MICA, Institut MICALIS, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, France

⁷Département d'Hépatologie - Centre National de Référence des Maladies Inflammatoires des Voies Biliaires, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France

Correspondence to

Prof Philippe Seksik, Service de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital St-Antoine, 184 rue du Faubourg St-Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France; philippe.seksik@sat.aphp.fr

HD, SR, PS and HS contributed equally

Revised 2 August 2012

Accepted 3 August 2012

Published Online First

19 September 2012



► <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302578>

ABSTRACT

Objective Gut microbiota metabolises bile acids (BA). As dysbiosis has been reported in inflammatory bowel diseases (IBD), we aim to investigate the impact of IBD-associated dysbiosis on BA metabolism and its influence on the epithelial cell inflammation response.

Design Faecal and serum BA rates, expressed as a proportion of total BA, were assessed by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in colonic IBD patients (42) and healthy subjects (29). The faecal microbiota composition was assessed by quantitative real-time PCR. Using BA profiles and microbiota composition, cluster formation between groups was generated by ranking models. The faecal BA profiles in germ-free and conventional mice were compared. Direct enzymatic activities of BA biotransformation were measured in faeces. The impact of BA on the inflammatory response was investigated in vitro using Caco-2 cells stimulated by IL-1 β .

Results IBD-associated dysbiosis was characterised by a decrease in the ratio between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli*. Faecal-conjugated BA rates were significantly higher in active IBD, whereas, secondary BA rates were significantly lower. Interestingly, active IBD patients exhibited higher levels of faecal 3-OH-sulphated BA. The deconjugation, transformation and desulphation activities of the microbiota were impaired in IBD patients. In vitro, secondary BA exerted anti-inflammatory effects, but sulphation of secondary BAs abolished their anti-inflammatory properties.

Conclusions Impaired microbiota enzymatic activity observed in IBD-associated dysbiosis leads to modifications in the luminal BA pool composition. Altered BA transformation in the gut lumen can erase the anti-inflammatory effects of some BA species on gut epithelial cells and could participate in the chronic inflammation loop of IBD.

INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), the two main inflammatory bowel diseases (IBD), are characterised by chronic and relapsing inflammation of the gastrointestinal tract.¹ Although their pathogenesis remains puzzling, it is thought to involve the inappropriate and ongoing activation

Significance of this study

What is already known on this subject

- Microbiota impacts on gut homeostasis.
- Dysbiosis is involved in inflammatory bowel diseases (IBD) pathophysiology.
- Bile acids (BAs) metabolism depends of gut microbiota activity.
- BAs exerts anti-inflammatory effects on macrophages.

What are the new findings

- Faecal dysmetabolism of BAs is observed in IBD.
- This dysmetabolism is linked to IBD-associated dysbiosis.
- High rates of sulphated BAs is found in faeces of IBD patients.
- Dysmetabolism of BAs could impact on inflammatory loop in IBD.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- BAs dysmetabolism could be used as a surrogate marker of IBD.
- Modulation of gut microbiota and/or BAs content could impact on IBD clinical course.

of the mucosal immune system driven by the presence of intestinal microbiota.^{2–3} The human gut microbiota represents the highest cell densities (10^{13} – 10^{14} micro-organisms)⁴ recorded in any ecosystem. Two phyla, Bacteroidetes and Firmicutes, dominate gut microbiota biodiversity.⁵ The gut microbiota exerts physiological functions useful for the human host such that human metabolism is the result of both microbial and human attributes.⁴ However, deviation away from gut microbial balance, or 'dysbiosis', has been repeatedly reported in IBD and may have an impact on host metabolism.^{6,7}

Convergent data in IBD point to dysbiosis characterised by restricted biodiversity, temporal instability⁸ and decreased bacteria of the Firmicutes phylum.⁹ Among Firmicutes, *Faecalibacterium*

Inflammatory bowel disease

prausnitzii appears to be particularly under-represented in IBD patients.^{6 10–12} Within the gut lumen, enzymatic reactions performed by gut bacteria are responsible for bile acid (BA) biotransformation. BA is synthesised by the liver into its primary forms, namely cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), and then conjugated with glycine or taurine amino acids before excretion via biliary ducts. After the secretion of BA into the gut lumen during digestion, the microbiota performs two enzymatic reactions. Deconjugation of taurine or glycine by BA hydrolase¹³ is the preliminary step before hydroxysteroid dehydrogenation (transformation), which leads to the production of secondary BAs.¹⁴ Active reabsorption of conjugated BAs in the terminal ileum by specific transporters permits the return of BAs to the liver via portal circulation. In the liver, free BA is reconstituted with taurine or glycine before secretion into the biliary tract and intestinal lumen. This metabolic loop constitutes the enterohepatic cycle of BA.¹⁵ Thus, IBD-associated dysbiosis could induce BA dysmetabolism and affect gut homeostasis.

In addition to the well-known metabolic functions of lipid absorption and cholesterol homeostasis, BAs also act as signalling molecules to regulate their own biosynthesis,¹⁶ and participate in gut mucosal defences through their own antibacterial properties.^{17 18} This suggests that BA dysmetabolism has the potential to greatly influence the course and/or phenotype of IBD. Indeed, BAs have been repeatedly shown to be anti-inflammatory molecules able to decrease the synthesis of proinflammatory cytokines, like TNF- α in monocytes and macrophages, through NF- κ B inhibition.^{19–22}

For this reason, we hypothesised that IBD-associated dysbiosis could lead to BA dysmetabolism, and consequently, gut inflammation. In this study, we investigated patients with purely colonic IBD and observed IBD-associated dysbiosis and an imbalance in BA profiles in both faeces and sera. These results support the idea that BA dysmetabolism in IBD is related to the loss of gut microbiota function associated with dysbiosis. In addition, experiments *in vitro* suggest that this imbalance in BAs may play a role in chronic inflammation in IBD.

METHODS

Patients and samples

Blood (5 ml) and faecal samples were collected from 42 IBD patients (12 CD, 30 UC) during flare-ups ($n=23$) and remissions ($n=19$). A diagnosis of IBD was defined by clinical, radiological, endoscopic and histological criteria.²³ All IBD patients had purely colonic diseases with no ileal involvement, according to the Montreal classification system.²⁴ CD activity was defined as a Harvey–Bradshaw index score ≥ 4 ,²⁵ and active UC was defined as a Powell–Tuck index score >4 .²⁶ Patients with ileal involvement, or with biliary or liver comorbidities, were excluded from the study.

None of the study participants had taken antibiotics or used colon-cleansing products for at least 3 months prior to enrolment. The characteristics of the patients are presented in table 1. Fasting blood samples were centrifuged ($400\times g$, 10 min, 4°C) and the serum was stored at -80°C for further analysis. Whole stools were collected in sterile boxes and immediately homogenised, and 0.2 g aliquots was frozen at -80°C for further analysis. Control blood and faecal samples were obtained from 29 healthy subjects (HS) using the same protocol. Informed consent was obtained for all participants, and the study was approved by the local ethics committee (25 January 2005).

Bile-acid profiles

Chemicals and reagents

All chemicals and solvents were of the highest purity available. CA, deoxycholic acid (DCA), CDCA, ursodeoxycholic acid (UDCA), lithocholic acid (LCA), hyocholic acid and the corresponding glyco- and tauro-derivatives were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The 3-sulphate derivatives were a generous gift from Dr J Goto (Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, Niigata, Japan) and the 23-nor-5 β -cholanoic acid-3 α , 12 α -diol was purchased from Steraloids, Inc (Newport, Rhode Island, USA). Because 3-sulpholithocholic acid is not commercially available, it was synthesised in our laboratory (ENS, Paris) using a previously described method,²⁷ and further characterised by nuclear

Table 1 Characteristics of the study subjects

	Active CD	Active UC	Total	Remission CD	Remission UC	Total	Healthy subjects
IBD							
n (%)	7 (17)	16 (38)	23 (55)	5 (12)	14 (33)	19 (45)	29
Mean age (\pm SEM)	37.6 \pm 19	36.0 \pm 14	37.0 \pm 15	42.1 \pm 19	37.5 \pm 12	38.7 \pm 14	34.6 \pm 14
Male %	43	44	43	40	64	58	38
Montreal classification							
L1	0	—	0	0	—	0	—
L2 (%)	7 (17)	—	7 (17)	5 (12)	—	5 (12)	—
L3	0	—	0	0	—	0	—
E1 (%)	—	2 (5)	2 (5)	—	0	0	—
E2 (%)	—	6 (14)	6 (14)	—	4 (10)	4 (10)	—
E3 (%)	—	7 (17)	7 (17)	—	8 (17)	8 (17)	—
Treatment							
Corticosteroids (%)	3 (7)	8 (19)	11 (26)	0	1 (2)	1 (2)	—
Mesalazine (%)	1 (2)	5 (12)	6 (14)	1 (2)	6 (14)	7 (17)	—
Methotrexate (%)	1 (2)	3 (7)	4 (10)	0	0	0	—
Purine analogues (%)	1 (2)	1 (2)	2 (5)	2 (5)	5 (12)	7 (17)	—
Infliximab (%)	3 (7)	7 (17)	10 (24)	2 (5)	5 (12)	7 (17)	—
Adalimumab (%)	0	0	0	0	2 (5)	2 (5)	—
Certolizumab (%)	0	0	0	1 (2)	0	1 (2)	—
Ciclosporin (%)	0	1 (2)	1 (2)	0	1 (2)	1 (2)	—
Antibiotics	0	0	0	0	0	0	0

CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis.

magnetic resonance and mass spectrometry. Acetic acid, ammonium carbonate and ammonium acetate were also purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier).

Standard solutions

Standard stock solutions were prepared in methanol at a concentration of 1 mg/ml and stored in a sealed container at -20°C . The stock solutions were pooled and diluted to obtain mixed-calibration BA solutions, ranging from 31.3 $\mu\text{g/ml}$ to 31.3 ng/ml.

Sample preparation

Two microlitres of an internal standard solution (23-nor-5 β -cholanoic acid-3 α , 12 α -diol at 1 mg/ml) was added to either serum (500 μl) or 0.1 g of faecal lyophilised samples using a Thermo Savant Speedvac (SPD 111V) coupled to a cooled vapour trap (RTV400). The BAs were released from the binding protein by the addition of 0.4 M ammonium carbonate, at a concentration of 4 ml ammonium carbonate per 1 ml of sample, and incubated for 30 min at 60°C . For faecal samples, 2 ml of NaOH (0.1 M) was added and incubated for 1 h at 60°C before the addition of 4 ml of water.²⁸ The solution was homogenised by two 30 s runs in an Ultra-Turrax disperser (IMLAB, Lille, France). The preanalysis cleanup procedure was achieved by centrifugation (20 000 $\times g$ for 20 min) followed by solid-phase extraction using reversed-phase silica cartridges. These reversed-phase Chromabond C18 cartridges (100 mg; Macherey-Nagel, Düren, Germany) were preconditioned with 5 ml of methanol and 5 ml of water in succession. Samples were then loaded on the cartridge, and the subsequent elution steps were processed using a vacuum manifold. The cartridge was rinsed with water (20 ml), followed by hexane (10 ml), and then rinsed a second time with water (20 ml). The BAs were finally eluted and collected by methanol eluate. The methanol was evaporated under nitrogen at 50°C , and the residue was resuspended in 150 μl of methanol, 5 μl of which was injected into the high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC MS/MS) system.

HPLC MS/MS analysis

For the HPLC MS/MS analysis, the separation of BAs as a function of polarity was accomplished using an analytical column (Pinnacle II C18, Restek, Lisses, France; 250 mm \times 3.2 mm (L \times ID), 5 μm silica particle (Restek)) fitted on an HPLC binary pump (Agilent 1100, Agilent Technologies France, Massy, France). The transfer line from the autosampler (Agilent) and column was maintained at 35°C . The 0.3–0.5 ml/min flow rate was increased during the elution protocol. The mobile phase was composed of a mixture of ammonium acetate (15 mM, pH 5.3) and methanol. The HPLC was coupled in series with the turbo ion-spray source of the tandem mass spectrometer (QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada). Electrospray ionisation was performed in the negative mode, with nitrogen as the nebuliser gas. The temperature of the evaporation gas was set at 400°C . The ion-spray, declustering and entrance potentials were set at -4500 V, -60 V and -10 V, respectively. Collision-induced dissociation was achieved in a Q2 collision cell under various voltage potentials, depending on conjugation, and MS/MS detection was operated with unit/unit resolution in the multiple-reaction-monitoring (MRM) mode. The dwell time of the ion trap was set at 70 ms for each transition. Data were acquired using Analyst V1.4.2 software.

MRM at low collision energy focuses on transition reactions from precursor ions to product ions after the cleavage of taurine, glycine and sulphate fragments. For glycine-conjugated BAs, m/z 432, 448 and 464 were selected as the precursor ions, and m/z 74 was selected as the product ion. For taurine-conjugated BAs, m/z 482, 498 and 514 were selected as the precursor ions, and m/z 80 was selected as the product ion. For sulpho-conjugated BAs, the HSO_4 sulphuric anion (m/z 97) from the sulphate moiety was selected as the product ion. For unconjugated BAs, m/z 375, 391 and 407 were selected as both the precursor and product ions, as no fragmentation could be identified at the low collision energy used. In addition, m/z 377 was selected for the internal standard (23-nor-5 β -cholanoic acid-3 α , 12 α -diol). The BA quantitation was expressed as the percentage of each specific BA (\pm SEM) out of the total BAs after calibration of the method, with weighed mixtures and normalisation relative to the internal standard (nordeoxycholic acid).

Bacterial analysis of faecal samples

DNA was extracted from 200 mg of faeces⁹ and real-time qPCR was performed as previously described.¹² Briefly, a qPCR thermocycler (Stratagene Mx3000P, La Jolla, California, USA) was used to quantify the total bacteria and the dominant bacterial groups in the microbiota using a 96-well plate format with SYBR Green PCR Master Mix (2X). Each reaction was performed in duplicate in a final volume of 25 μl , with a 0.2- μM final concentration of each primer, and 10 μl of the appropriate dilutions of DNA samples. Amplifications were performed at 95°C for 10 min to denature the DNA and activate the AmpliTaq Gold Polymerase, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s and at 60°C for 1 min. A dissociation step was added, and the dissociation curves were analysed to confirm the identity and fidelity of the amplification of SYBR Green products. The real-time species-specific 16S rRNA-targeted primers used in this study were purchased from MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany). The primer sequences used have been described elsewhere.¹² To take into account the difference in water content between faecal samples, the data for each faecal sample were normalised.²⁹ The level observed for each particular dominant and subdominant bacterial population was subtracted from the all-bacteria content, and the results are expressed as the log 10 of the number of bacteria per gram of stool.

Caco-2 cell experiments

The human colon cancer cell line Caco-2, from the European Collection of Cell Cultures (Wiltshire, UK), was cultured in 12- or 24-well culture plates in DMEM (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France), supplemented with 20% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) and 1% non-essential amino acids (Invitrogen), at 37°C in a 10% carbon dioxide/air atmosphere. The culture media were changed every day. Experiments were initiated on days 20 and 21 after seeding (previously shown to be an early stage of differentiation, corresponding to the upper crypt lower villus stage of differentiation). The culture medium was then changed to DMEM plus 10% FCS 12 h before the BA challenge. At t_0 , the cells were supplemented with interleukin (IL)-1 β and several BA species (CA, CDCA, DCA, LCA and LCA-3S) at increasing concentrations (from 100 μM to 500 μM). After 6 h of incubation, supernatants were removed for the IL-8 assay (inflammatory response), with extraction for HPLC MS/MS BA identification. The cells were washed and scraped into a lysis buffer (phosphate buffer saline plus 1% Triton X-100) for the protein assay, and IL-8 was delivered to

Inflammatory bowel disease

the total cell-protein content. An ELISA assay was performed (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). All experiments were performed in duplicate.

Measurement of BA biotransformation activity by the faecal microbiota

Ten milligrams of lyophilised stool was rehydrated in 200 µl of 4°C water before homogenisation.^{30 31} Pure BA (LCA-3S, GUDCA, California, USA) solutions were added separately for a final concentration of 5 mM and mixed with each stool homogenate at 37°C. For each sample, experiments were halted at different time points (0 min, 30 min, 180 min and 12 h) using three steps: (1) addition of 100 µl of 0.2 N NaOH, (2) shaking and (3) addition of 1 ml of 4°C water. After centrifugation (10 000 RPM for 20 min), LCA, UDCA and DCA were measured from the LCA-3S, GUDCA and CA-supplemented stool homogenate, respectively. BA extraction was performed following the proper protocol. Direct enzymatic activities were detected in each experiment by the increase in LCA, UDCA and DCA. BA concentrations were estimated by the area under curve (AUC) of specific HPLC MS/MS BA profiles and reported as the mean BA in each experiment. The results are expressed in per cent BA.

Germ-free and conventional mice

Germ-free and gnotobiotic 10- to 12-week-old male mice (C3H/HeN) were obtained from the germ-free rodent-breeding facilities of the MICALIS unit at INRA (Jouy-en-Josas, France). Throughout the study, the animals were kept inside flexible film isolators (Getinge-La Calhène, Vendôme, France) in standard macrolon cages (five mice/cage) with sterile wood shavings as bedding. The animals were given free access to autoclaved tap water and a standard pellet diet (R03-40, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France), sterilised by gamma irradiation at 45 kGy (IBA Meridis, Fleurus, Belgium). The isolators were maintained under controlled conditions of light (0730h–1930h), temperature (20°C–22°C) and humidity (45%–55%). The C3H/HeN germ-free mice received 0.5 ml of a 1/100 dilution of faeces from conventional mice for 2 days by gastric gavage. After 3 weeks (time to bacterial stability), their faecal samples were studied. All procedures were performed in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals.

Statistical analysis

Statistical analyses for significant differences were performed with the Student t test for unpaired data, and by Wilcoxon's non-parametric test when appropriate. Qualitative data were compared within groups using the χ^2 test. Discriminations of disease phenotype (ie, active IBD, IBD in remission and HS)

based on faecal microbiota composition, and faecal BA profiles were performed. The class probability function was used. Scoring functions among five learning schemes were trained and tested from a classification task for maximising AUC. We used 31 runs of 7-fold cross-validation to test the accuracy and AUC. The ranking capability was finally assessed by the AUC. The attributes of subsets were evaluated using each learning scheme. For a feature subset selection, we used a classic iterative search-based technique to find low-dimensional projections of the data that have high AUC scores. All calculations were performed using Weka 3-7-5 open source software (<http://www.cs.waikato.ac.nz/~ml/weka/index.html>) from Waikato University.

RESULTS

Dysbiosis in IBD

The faecal microbiota composition was available for all of the subjects, and is presented in table 2.^{29 32} In IBD patients in remission, dysbiosis was characterised by a decrease in bacteria from the Firmicutes phylum (ie, significant decrease in *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum* and *F. prausnitzii* at a species level). In flare, dysbiosis was characterised by a more profound decrease in bacteria from the Firmicutes phylum, and an increase in *Lactobacillus* and enterobacteria (*E. coli* at a species level). However, there were no significant differences between CD and UC patients both in flare and in remission (table 2).

Using the ratio between *F. prausnitzii* and *E. coli* as a marker of dysbiosis, a decrease in dysbiosis was observed in IBD patients, and the decrease was more significant in active IBD (Figure 1).

Dysmetabolism of BA in the faeces of IBD patients

Total faecal BA concentrations were similar between IBD and HS (see online supplementary file S1). The proportion of conjugated BAs increased in IBD patients compared with HS, as shown in figure 2D. The proportion of secondary BAs decreased in IBD patients, particularly during flare, as represented in figure 2B. Furthermore, a much higher proportion of 3-OH-sulphated BA was found in the faeces of patients with active IBD compared with patients with IBD in remission and HS (figure 2F). Finally, we also looked at BA concentrations in sera and did not observe any difference between IBD and HS except for secondary BA (figure 2A). Indeed, the association of normal total BA concentrations with a decrease in the secondary BA level in the sera of IBD patients suggests that this decrease is a consequence of an impaired luminal bacterial BA metabolism. Levels of primary and total BAs in the sera were in the normal range, confirming the absence of cholestasis in the study subjects. Altogether, these results suggest that IBD patients exhibit defective BA intestinal metabolism.

Table 2 Microbial composition in IBD patients and healthy subjects (HS)

	All bacteria	Enterobacteria	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bifidobacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Clostridium coccoides</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Clostridium leptum</i>
HS	11.58±0.4	-4.02±0.7	-3.97±0.8	-2.67±0.5	-3.79±0.6	-0.69±0.5	-1.08±0.6	-1.27±0.5	-1.65±0.5
Remission IBD	11.15±0.5*	-3.40±1.0	-3.47±0.9	-2.67±0.7	-3.53±0.9	-1.19±1.0*	-1.16±1.0	-1.72±1.1*	-2.07±0.6*
Flare IBD	10.66±0.9*	-2.72±1.0*	-2.59±1.0*	-2.90±1.2	-2.86±1.2*	-1.18±1.3*	-1.36±1.3	-2.15±1.5*	-2.24±1.1*
CD	10.96±0.6	-2.69±0.9	-2.68±0.8	-2.61±0.9	-3.36±0.8	-1.22±0.6	-1.11±1.0	-2.17±1.4	-2.15±0.8
UC	10.91±0.9	-3.23±0.9	-3.18±1.0	-2.88±1.1	-3.05±1.2	-1.14±1.3	-1.30±1.3	-1.95±1.3	-2.17±1.1

*Significant comparison with healthy subjects $p<0.05$.

All-bacteria results obtained by qPCR are expressed as the mean values of the log10 value±SEM. The results are expressed as the mean values of the normalised value±SEM, calculated as the log number of all bacteria minus the log number of targeted bacteria.

CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel diseases; UC, ulcerative colitis.

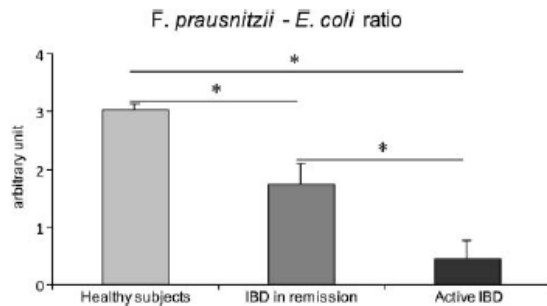


Figure 1 the ratio between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel diseases (in remission and active disease) versus healthy subjects. Values are expressed as a ratio \pm SEM; * $p < 0.0001$. All-bacteria results obtained by qPCR are expressed as mean of the log10 value. The ratio is calculated as the log number of *Faecalibacterium prausnitzii* minus the log number of *E. coli*.

As BA metabolism in the gut is largely the result of microbiota enzymatic activity, we accounted for both BA and microbiota profiles in a class probability function three-dimensional plot. We were able to discriminate HS from active IBD patients and IBD patients in remission (figure 3). The model description (tests and performance) of the each attribute dataset is given in supplementary file S2.

Dysbiosis leads to BA dysmetabolism

We explored a direct connection between dysbiosis and BA dysmetabolism. We chose an extreme animal condition to confirm the major role of the gut microbiota in shaping the faecal BA

profile. Thus, we compared the faecal BA profile in germ-free and in conventional mice. The former exhibited virtually undetectable secondary BAs ($1.8 \pm 0.2\%$ relative to the total BA) compared with the latter mice ($88 \pm 1.7\%$; $p = 0.049$). Furthermore, the germ-free mice exhibited a higher proportion of conjugated BAs ($86.8 \pm 0.8\%$ vs $2.5 \pm 0.2\%$, respectively; $p = 0.049$) and of 3-OH-sulphated BA ($11.7 \pm 0.9\%$ vs $1.8 \pm 0.3\%$, respectively; $p = 0.049$), than did the conventional mice. These results highlight the role of the microbiota in deconjugation and dehydroxylation, and in BA desulphation (figure 4).

Finally, we assessed the BA biotransformation directly induced by the gut microbiota of IBD patients and HS. As expected, the gut microbiota of HS was able to efficiently deconjugate, transform and desulphate BAs. However, these metabolic functions were impaired in the gut microbiota of IBD patients, particularly during flare (figure 5).

Functional impact of BA dysmetabolism

To explore the potential consequences of BA dysmetabolism on the epithelial inflammatory response, we used a Caco-2 intestinal epithelial cell model. The effects of several types of BAs were tested on IL-1 β -induced IL-8 secretion. Primary BAs (CA and CDCA) had no effect, whereas, secondary BAs (DCA and LCA)-inhibited IL-1 β -induced IL-8 secretion. A dose-response relationship was observed with LCA, with no IL-8 secretion at a concentration of 500 μ M of LCA. Moreover, sulphation of LCA abolished this anti-inflammatory effect (figure 6). We checked that the inhibitory effect was not related to cellular toxicity by performing an Lactate Dehydrogenase (LDH) assay, presented in supplementary file S3. Taken together, these results suggest that BA dysmetabolism in IBD could be involved in the enhancement of the epithelial inflammatory response.

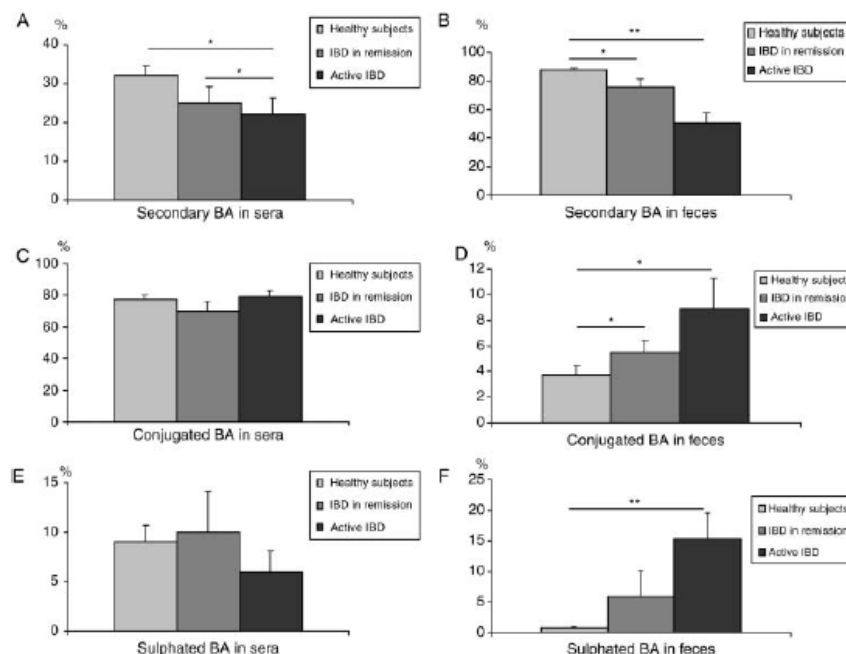


Figure 2 Proportion of faecal and sera bile acid (BA) in healthy subjects and in patients with inflammatory bowel diseases (in remission and active disease): secondary BA in sera (A) and faeces (B); conjugated BA in sera (C) and in faeces (D); sulphated BA in sera (E) and in faeces (F). Values are expressed as % \pm SEM of total BA; * $p = 0.03$, ** $p = 0.02$, *** $p = 0.0004$.

Inflammatory bowel disease

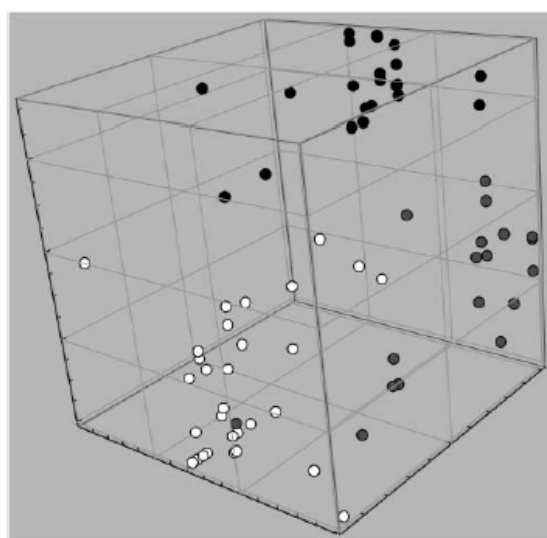


Figure 3 Discrimination of disease phenotype based on faecal microbiota composition and faecal bile acid profiles. Healthy subjects: white dots; Active inflammatory bowel diseases (IBD): black dots; IBD in remission: grey dots. Class probability function was used. Scoring functions were trained and tested from a classification task towards maximising AUC (see S1).

DISCUSSION

Here, we investigated the connections between gut microbiota and BA metabolism in IBD. We demonstrated that IBD-associated dysbiosis leads to impaired BA metabolism characterised by defective deconjugation, transformation and desulphation. Moreover, we demonstrated that IBD-associated BA dysmetabolism within the gut lumen might enhance the intestinal epithelial inflammatory response, and thus, worsen IBD.

We first assessed faecal and blood BA profiles in IBD patients and healthy controls. Although patients were not gender matched, there was no significant difference between the IBD and healthy control groups ($p>0.2$). To create a homogeneous group of patients, the inclusion criteria were stringent. We excluded patients with abnormal liver tests or known liver diseases to avoid basal perturbations of BA biosynthesis, which may be observed—for example, in cholestatic diseases, such as

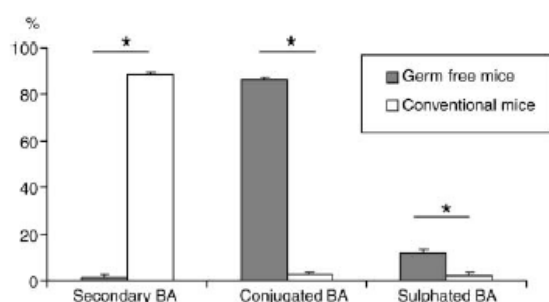


Figure 4 Bile-acid composition in the faeces of germ-free versus conventional mice according to HPLC MS/MS (E). Values are expressed as %±SEM of total faecal bile acid; * $p=0.05$.

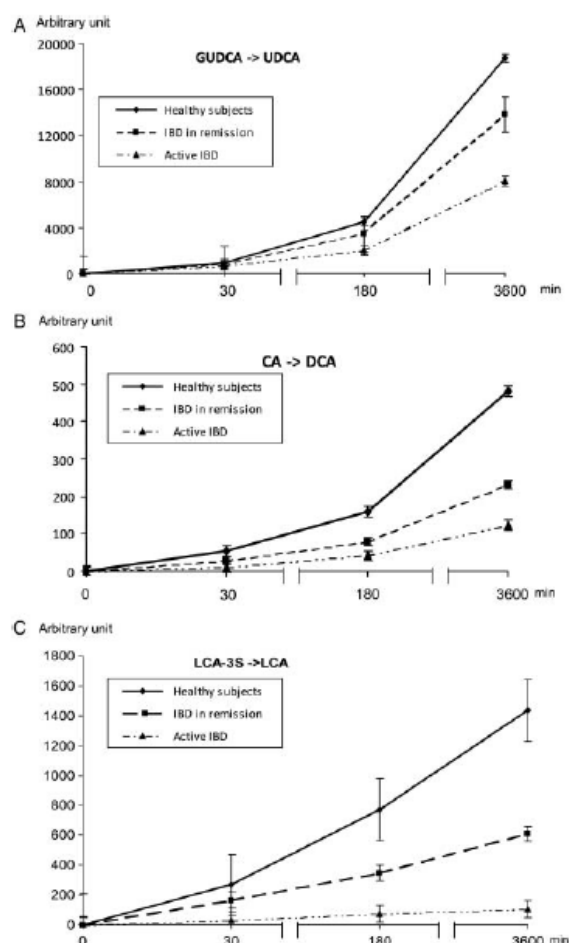


Figure 5 Bile acids deconjugation (A), transformation (B) and desulphation (C) induced by the gut microbiota of active inflammatory bowel diseases (IBD), IBD in remission and healthy subjects. Values are expressed as arbitrary unit±SEM.

primary sclerosing cholangitis (often associated with IBD).^{33–34} As the terminal ileum is the site of BA reabsorption,^{35–37} CD patients with ileal involvement were also excluded by principle. A systematic search for associated BA malabsorption would have been interesting, but was impossible because neither scintigraphic nor blood diagnostic tests were available in France. Our patients were well-phenotyped patients, selected from a worldwide known database (MICISTA Saint-Antoine Hospital, Paris, France). However, we could not rule out the possibility that passive BA diffusion in the colon led to a change in the BA profile in colonic IBD patients. To preserve the integrity of the gut microbiota, all patients included had to be free of antibiotics 3 months prior to sampling.^{38–39} Thus, having cautiously enrolled IBD patients and HS, we used state-of-the-art mass spectrometry (HPLC MS/MS) to measure molecular species of BAs from faecal content. After examining these data and the faecal microbiota composition, we generated a hypothesis connecting IBD-associated dysbiosis and BA metabolism.

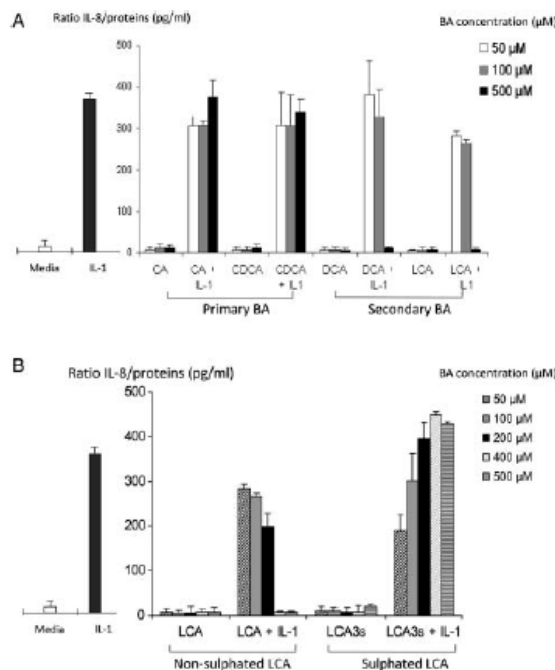


Figure 6 Interleukin (IL)-8 secretion by Caco-2 cells after IL-1 β stimulation, as measured by EUSA: (A) experiments with primary (cholic acid and chenodeoxycholic acid) and secondary (deoxycholic acid and lithocholic acid (LCA)) bile acids; and (B) experiments with sulphated and non-sulphated LCA. Values represent IL-8/total protein (pg/ml) quantities in media after 6 h.

We then performed several experiments supporting a direct connection between gut microbiota and BA biotransformation. Deconjugation and dehydroxylation of BAs depend on gut microbiota activity. A decrease in bacteria-bearing Bile Salt Hydrolase activities might be involved in the increase in the conjugated BAs remaining in the faeces. Although one cannot rule out the role of the global decrease of gut microbiota, our results clearly indicate that the decrease in total bacteria is mainly due to a lack in Firmicutes. Among all the bacteria of the gut, Firmicutes and Bacteroidetes are the most potent deconjugating bacteria.^{40–41} Thus, a decrease in non-conjugated and secondary BAs may be considered a reliable marker of IBD-associated dysbiosis. Although enzymatic redundancy is found with BA deconjugation, measurement of the metabolic activity of faecal samples from IBD patients demonstrated impaired function, especially during flare. In vivo BA transformation depends on many bacterial strains forming a metabolic chain,⁴² and BA deconjugation represents a limiting step in the BA biotransformation pathway.^{13–43} Germ-free mice experiments highlighted the loss of function observed in IBD patients demonstrating increases in primary, conjugated and sulphated BA.

The present protocol was adapted for faecal samples, and HPLC MS/MS^{44–45} was able to discriminate species with high resolution, and to quantify 3-OH-sulphated BA. In sera, there was no difference in the 3-OH-sulphated BA concentration between patients and controls. This might be due to the rapid urinary clearance of sulphated BA. However, given that the gut

lumen is a source of 3-OH-sulphated BA,^{46–47} these results suggest a balance between intestinal-wall BA sulphation on one hand, and microbiota desulphation on the other. Looking at our results at the level of BA species, we found primary as well as secondary sulphated BAs. A change in the BA profile with high rates of primary BAs cannot explain the excess of sulphation. To address this question, we performed a sulphatase activity assay that revealed decreased activity in the faeces of IBD patients. The high proportion of faecal 3-OH-sulphated BAs in germ-free mice supports the idea of 3-OH-sulphated BA genesis in the intestinal wall, with intestinal expression of BA sulphotransferases in human intestinal cells.^{46–48} Other alterations due to derivative sulphation can be evoked in vivo. It is well known that gut bacteria, such as *Bacteroides* and *Clostridium*, support sulphatase activity, at least at the genomic level.^{49–50} Sulphatases are able to separate the 3-OH-sulphonate group from BA (desulphation of BA). However, little is known about overt sulphatase activity within the gut because of difficulties in manipulating obligate anaerobes. Thus, the combination of dysbiosis and BA dysmetabolism suggests a loss of microbiota function in IBD. Indirect mechanisms may also be involved. Gut bacteria could modulate intestinal sulpho-transferase activity (sulphation of BAs) through modulators that interfere locally with ileal epithelial cells or colonocyte signalling.⁵¹ In addition, gut microbiota could trigger overall BA biosynthesis—and 3-OH-sulphated BAs in particular—via the gut-liver axis through regulation of nuclear receptors, such as Farnesoid X Receptor (FXR) expressed in ileal epithelial cells.⁵²

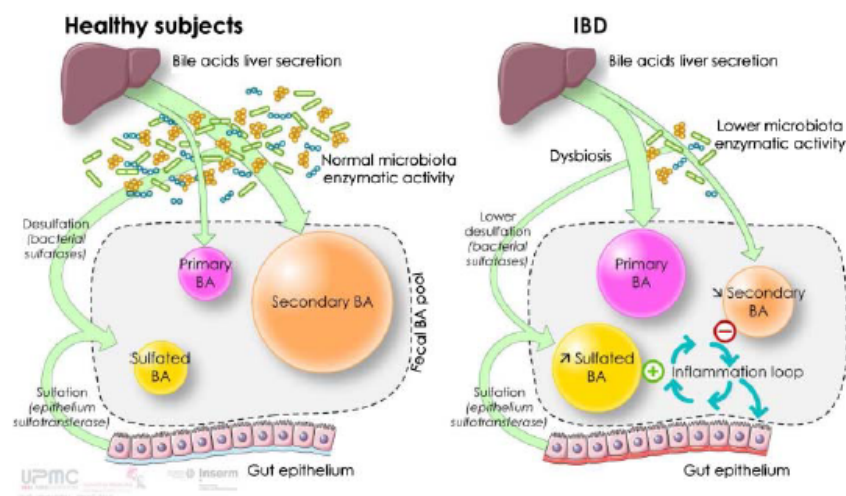
The anti-inflammatory properties of secondary BAs were first described 20 years ago based on the observation that chronic cholestasis is associated with immunosuppression. This led to the demonstration that BAs inhibit the secretion of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in macrophages.^{21–53} Recently, it has been established that this downregulation was mediated by the BA-specific membrane receptor TGR5. This G-protein-coupled receptor can reduce proinflammatory cytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α) production induced by lipopolysaccharides in Kupffer cells and macrophages through NF- κ B inhibition.¹⁹ TGR5 is mostly activated by secondary BAs, including LCA and DCA. Therefore, it is important to note that in humans, the strongest activator of the TGR5 anti-inflammatory receptor is produced by the gut microbiota. The anti-inflammatory effect of LCA has been described elsewhere.⁵⁴ Interestingly, a TGR5 agonist can attenuate Trinitrobenzene Sulfonic acid (TNBS), which induces colitis in mice.⁵⁵

We designed our in vitro experiments using a Caco-2 cell assay to model and understand whether the lower proportion of secondary BAs in faeces could influence inflammation pathways in colonic mucosa. These assays confirm that secondary BAs (LCA and DCA) can exert anti-inflammatory effects in human colonic epithelial cells independently of any cytotoxic effect of BAs on cells. Interestingly, this effect was lost after 3-OH-sulphation. Thus, one can hypothesise that the anti-inflammatory properties of secondary BAs on Caco-2 cells we report here could be TGR5 dependant.

We propose the following physiopathological model, which implicates luminal BA dysmetabolism in the gut inflammation observed in IBD (figure 7). In HS, normal microbiota enzymatic activity leads to a physiological luminal BA pool that is mostly composed of secondary BAs and very low levels of primary and 3-OH-sulphated BAs. However, in IBD patients, impaired microbiota enzymatic activity leads to modification in the luminal BA pool composition, with increased sulphated BAs at

Inflammatory bowel disease

Figure 7 Physiopathological model of luminal bile acid dysmetabolism in inflammatory bowel diseases. This figure is only reproduced in colour in the online version.



the expense of secondary BAs. These changes contribute to the loss of the anti-inflammatory effects of secondary BAs on intestinal epithelial cells, while enhancing chronic inflammation.

Dysbiosis in IBD is generally described as a qualitative and quantitative imbalance in the gut microbiota. This study establishes a credible link between perturbation of the gut microbiota composition and clinical outcomes. In light of this study, BA appears to be a new player in IBD, participating in the proinflammatory 'vicious cycle' between the gut microbiota and host.

Acknowledgements The authors wish to thank MR Popoff, JP Carlier and M Manich of the Anaerobic Bacteria and Toxins Unit of the Pasteur Institute in Paris, France, Yves Chrétien of the Pitié and Marie Curie University in Paris, France, and Mrs Eugénie Hu for her assistance with the manuscript.

Contributors HD, SR, HS, PS wrote the paper. All the authors, except LB, JC, OC, RP, GT, PL, CW, JM performed the lab experiments and designs. LB, JC, OC, RP, GT, PL, JM gave critical revision of the manuscript. CW and DB performed statistical analysis.

Competing interests For the present work, the authors declare no conflict of interest. For the current year, Prof Seksik received consulting fees from Biocodex, Ferring pharmaceutical, MSD and Abbott. Prof Cosnes received consulting fees from Ferring pharmaceutical, MSD and Abbott. Prof Beaugerie received consulting fees from Biocodex, Ferring pharmaceutical, MSD and Abbott. The remaining authors disclose no conflict.

Ethics approval Local ethics committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126:1620–33.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:117–29.
- Guarner F, Malagelada JR. Bacterial flora of the digestive tract. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26(Suppl 1):1–5.
- Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009;136:65–80.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635–8.
- Sokol H, Lay C, Seksik P, et al. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:858–67.
- Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:1–4.
- Martinez C, Antolin M, Santos J, et al. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* 2008;103:643–8.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16731–6.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13780–5.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, et al. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:147–61.
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1183–9.
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon FB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;47:241–59.
- Batta AK, Salen G, Aroa R, et al. Side chain conjugation prevents bacterial 7-dehydroxylation of bile acids. *J Biol Chem* 1990;265:10925–8.
- Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res* 2009;50:2340–57.
- Holt JA, Luo G, Billin AN, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* 2003;17:1581–91.
- Scotti E, Gilardi F, Godio C, et al. Bile acids and their signaling pathways: eclectic regulators of diverse cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 2007;247:77–91.
- Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, et al. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 2009;50:1509–20.
- Keitel V, Donner M, Winandy S, et al. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372:78–84.
- Wang YD, Chen WD, Yu D, et al. The G-Protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice. *Hepatology* 2011;54:1421–32.
- Greve JW, Gourma DJ, Buurman WA. Bile acids inhibit endotoxin-induced release of tumor necrosis factor by monocytes: an in vitro study. *Hepatology* 1989;10:454–8.
- Pols TW, Nomura M, Harach T, et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab* 2011;14:747–57.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:2–6; discussion 16–9.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749–53.
- Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T, et al. Elucidating the chromosome 9 association with AS: CARD9 is a candidate gene. *Genes Immun* 2010;11:490–6.
- Powell-Tuck J, Bown RL, Lennard-Jones JE. A comparison of oral prednisolone given as single or multiple daily doses for active proctocolitis. *Scand J Gastroenterol* 1978;13:833–7.
- Tserng KY, Klein PD. Synthesis of sulfate esters of lithocholic acid, glycolithocholic acid, and taurothithocholic acid with sulfur trioxide-triethylamine. *J Lipid Res* 1977;18:491–5.
- Humbert L, Maubert M, Wolf C, et al. Bile acid profiling in human biological samples: comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. *J Chromatogr B* 2012;899:135–45.
- Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011;6:e16393.
- Thomas LA, Veysey MJ, French G, et al. Bile acid metabolism by fresh human colonic contents: a comparison of caecal versus faecal samples. *Gut* 2001;49:835–42.
- Thomas LA, King A, French GL, et al. Cholyglycine hydrolase and 7alpha-dehydroxylase optimum assay conditions in vitro and caecal enzyme activities ex vivo. *Clin Chim Acta* 1997;268:61–72.

32. **Mariat D**, Firmesse O, Levenez F, *et al*. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009;**9**:123.
33. **Sokol H**, Cosnes J, Chazouilleres Q, *et al*. Disease activity and cancer risk in inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2008;**14**:3497–503.
34. **Ananthakrishnan AN**, Beaulieu DB, Ulitsky A, *et al*. Does primary sclerosing cholangitis impact quality of life in patients with inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:494–500.
35. **Kwon RS**, Carey MC. Do steroids ameliorate bile acid malabsorption in Crohn's disease? *Gut* 2004;**53**:10–1.
36. **Pereira SP**, Bain IM, Kumar D, *et al*. Bile composition in inflammatory bowel disease: ileal disease and colectomy, but not colitis, induce lithogenic bile. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;**17**:923–33.
37. **Van Limbergen J**, Russell RK, Nimmo ER, *et al*. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut* 2007;**56**:1173–4.
38. **Edlund C**, Nord CE. Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2000;**46**(Suppl A):41–8.
39. **Engelbrektson A**, Korzenik JR, Pittler A, *et al*. Probiotics to minimize the disruption of faecal microbiota in healthy subjects undergoing antibiotic therapy. *J Med Microbiol* 2009;**58**(Pt 5):663–70.
40. **Jones BV**, Begley M, Hill C, *et al*. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:13580–5.
41. **Narushima S**, Ito K, Miyamoto Y, *et al*. Deoxycholic acid formation in gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria. *Lipids* 2006;**41**:835–43.
42. **Narushima S**, Ito K, Takamine F, *et al*. Absence of cecal secondary bile acids in gnotobiotic mice associated with two human intestinal bacteria with the ability to dehydroxylate bile acids in vitro. *Microbiol Immunol* 1999;**43**:893–7.
43. **Narushima S**, Ito K, Kuruma K, *et al*. Composition of cecal bile acids in ex-germfree mice inoculated with human intestinal bacteria. *Lipids* 2000;**35**:639–44.
44. **Scherer M**, Gnewuch C, Schmitz G, *et al*. Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;**877**:3920–5.
45. **Perwaiz S**, Tuchweber B, Mignault D, *et al*. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 2001;**42**:114–19.
46. **Ahnouti Y**. Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci* 2009;**108**:225–46.
47. **Cowen AE**, Korman MG, Hofmann AF, *et al*. Metabolism of lithocholate in healthy man. II. Enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 1975;**69**:67–76.
48. **Hamilton JP**, Xie G, Raufman JP, *et al*. Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;**293**:G256–63.
49. **Huighebaert S**, Parmentier G, Eyssen H. Specificity of bile salt sulfatase activity in man, mouse and rat intestinal microflora. *J Steroid Biochem* 1984;**20**:907–12.
50. **Van Eldere J**, Robben J, De Pauw G, *et al*. Isolation and identification of intestinal steroid-desulfating bacteria from rats and humans. *Appl Environ Microbiol* 1988;**54**:2112–17.
51. **Meini W**, Sczesny S, Brigelius-Flohe R, *et al*. Impact of gut microbiota on intestinal and hepatic levels of phase 2 xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Drug Metab Dispos* 2009;**37**:1179–86.
52. **Vavassori P**, Mencarelli A, Renga B, *et al*. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol* 2009;**183**:6251–61.
53. **Calmus Y**, Guechot J, Pödevin P, *et al*. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α production by monocytes. *Hepatology* 1992;**16**:719–23.
54. **Sun J**, Mustafi R, Cerda S, *et al*. Lithocholic acid down-regulation of NF- κ B activity through vitamin D receptor in colonic cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;**111**:37–40.
55. **Cipriani S**, Mencarelli A, Chini MG, *et al*. The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PLoS One* 2011;**6**:e25637.

Les peptides anti-microbiens

Dans le cadre du même concept que dans l'étude des acides biliaires en faveur du rôle indirect du microbiote sur l'hôte, un déséquilibre des PAM est une piste sérieuse à envisager. Les PAM sont synthétisées par les cellules intestinales de l'hôte. Ils interviennent dans l'homéostasie de l'écosystème intestinal et constituent donc des acteurs de l'écosystème microbien intestinal, par leur propriétés bactéricides et immunomodulatrices. Certains travaux ont mis en évidence une défaillance de la barrière intestinale dont un déficit en défensines au cours de la maladie de Crohn.

Dans cette étude, la mise au point du dosage, par LC-MS/MS, des peptides antimicrobiens dans les selles a permis de montrer une diminution des défensines hBD1 et HD5 chez les patients MICI. De plus, nos résultats montrent une corrélation entre l'expression de certains PAM et la présence de certains groupes bactériens. En effet, la défensine hBD1 est positivement corrélée avec *F. prausnitzii* et le groupe des Bifidobactéries et la défensine HD5 positivement corrélée à *F. prausnitzii* et *C. leptum* et inversement corrélée à *E. coli*, aux groupes Entérobactéries et *C. coccoïdes*. La quantification de PAM dans les selles des patients atteints de MICI a permis de montrer une différence de profil de sécrétion par rapport aux sujets sains. La β défensine hBD1 est exprimée de manière constitutive par l'épithélium intestinal mais il a déjà été montré que dans les zones inflammatoires des patients atteints de MICI, l'expression de hBD1 est significativement diminuée (181). Dans notre étude, la sécrétion de hBD1 a été analysée dans sa globalité sans différenciation des zones du tractus digestif, et une diminution a été observée chez les patients en rémission. La régulation de la sécrétion pourrait être modulée par des processus non liés à l'inflammation. L'étude réalisée in vitro sur différents modèles de cellule épithéliale n'a pas permis de retrouver une stimulation de l'expression de hBD1 par la mise en contact de surnageants bactériens de la flore commensale. Le mécanisme indirect de stimulation par les acides biliaires n'a pas non plus été confirmé. Cependant, l'absence de stimulation de la production d'hBD1 par l'eau fécale de patients atteints de MICI, contrairement aux sujets sains, nous laisse penser qu'un mécanisme indirect de régulation est possiblement impliqué. La dysbiose observée au cours des MICI pourrait ainsi jouer un rôle dans l'inflammation chronique intestinale par son impact sur la sécrétion des PAM. Inversement la dysbiose pourrait être auto-entretenu par un déficit en PAM, et entretenir une inflammation chronique intestinale au cours des MICI. Une étude des spectres de d'activité des PAM sur les bactéries commensales a été effectuée dans cette hypothèse. hBD1 à forte concentration n'inhibe

pas la croissance de *F. prausnitzii* mais inhibe la croissance d'*E. coli*. Ces résultats nous incitent à penser que le déficit en hBD1 serait un facteur d'entretien de la dysbiose associé aux MICI.

Au cours de cette étude, nous avons également constaté une nette diminution de l' α -défensine HD5, normalement exprimée de manière constitutive par les cellules de Paneth, chez les patients en poussée comme en rémission atteints de MC comme de RCH. Sa diminution a été mise en évidence localement chez les patients ayant une atteinte iléale de MC et rapportée, d'une part, comme une conséquence de l'inflammation, entraînant une réduction du nombre de cellules de Paneth et d'autre part aggravée par la présence d'une mutation NOD2 (112). HD5 n'a jamais été dosé dans les selles de ces patients en l'absence d'atteinte iléale ni chez les patients atteints de RCH. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous pour tenter d'expliquer cette diminution : le peptide peut être sécrété soit en partie sous forme immature comme l'étude de *Elphick et al* le suggère et donc n'est pas détecté par spectrométrie de masse (182). Soit ce peptide est dénaturé et l'absence de ponts disulfures le rend de ce fait plus sensible à la dégradation enzymatique. La dysbiose observée pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'expression de la défensine HD5. Ces différentes hypothèses se doivent d'être explorées par la réalisation d'études complémentaires.

En résumé, nos résultats ont confirmé la présence d'une dysbiose au cours des MICI. Cette dysbiose est associée à un déficit en hBD1 et HD5 dans les selles. Ce résultat est inattendu car nos patients ont une atteinte exclusivement colique. L'étude réalisée in vitro sur différents modèles de cellules épithéliales n'a pas permis de retrouver une stimulation de l'expression de hBD1 par incubation de surnageants bactériens de la flore commensale. Inversement, le spectre d'activité antimicrobien de la défensine hBD1 sur les bactéries commensales évoque un facteur d'entretien de la dysbiose associé aux MICI. Nos résultats suggèrent que l'altération de l'expression de défensines est une caractéristique primaire dans les MICI qui peut perpétuer la dysbiose associée aux MICI.

DISCUSSION, CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les MICI sont des maladies fréquentes touchant des personnes jeunes avec une évolution chronique et invalidante. Elles représentent un défi majeur pour les cliniciens confrontés à ces patients. Ces pathologies ne sont à l'heure actuelle que partiellement comprises. Les possibilités thérapeutiques offertes aux médecins et patients, sont de plus en plus larges mais leur optimisation et leur gestion restent un questionnement permanent afin de stopper la progression de la maladie, empêcher la survenue de complications, mais également éviter les effets secondaires. La quête de marqueurs cliniques comme biologiques apparaît essentielle à une prise en charge personnalisée du patient, en particulier devant le risque d'évolution péjoratif de la maladie ou dans le cadre de la discussion d'une reprise d'un traitement en post opératoire ou enfin pour discuter l'arrêt de certains traitements chez les patients en rémission profonde. Cette thèse a pour point de départ le patient et avec pour but de tenter de répondre à 2 grandes questions : comment prédire la rechute de la maladie et quels sont les mécanismes physiopathologiques impliqués, afin d'améliorer la prise en charge de ces patients. Le microbiote intestinal tient une place centrale dans la physiopathologie des MICI et a constitué le cœur de cette thèse et guidé l'ensemble de ces travaux, en tant que biomarqueur mais aussi en tant qu'entité fonctionnelle de l'écosystème intestinal en symbiose avec l'hôte. Ces dernières années, l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathogénie des MICI a été mise en évidence par la description d'une dysbiose. Au-delà de l'action directe que peut exercer le microbiote, celui-ci s'inscrit dans un écosystème complexe dont le bon fonctionnement permet le maintien de l'homéostasie intestinale. Au cours d'une dysbiose, une modification du contenu luminal (acides biliaires, PAM, phages, nutriments ...) peut participer à la promotion d'une inflammation chronique. Ces modifications de l'écosystème sont autant de pistes pour tenter de restaurer une normobiose. Certaines pistes comme l'implication des acides biliaires nous paraissaient essentielles, par leur importance au sein du contenu luminal et leur modifications par le microbiote intestinale. D'autres pistes comme l'implication des PAM, régulateurs des populations microbiennes, paraissaient plus intuitives à mesurer au cours de la dysbiose associée aux MICI. Deux aspects ont été pris en compte pour les travaux menés au cours de cette thèse. Dans la première partie de ces travaux, l'étude STORI, menée dans le cadre de la recherche clinique, avec la force d'une étude multicentrique prospective dédiée aux marqueurs prédictifs, nous a permis d'explorer les valeurs prédictives de la dysbiose dans un contexte clinique. La rigueur de la recherche clinique dans l'inclusion des patients et le circuit effectué pour le prélèvement et la conservation d'échantillons, a permis de répondre à cette question spécifique. Les deux autres études ont visé à obtenir une

meilleure compréhension des modifications de l'écosystème intestinal, la sécrétion de PAM et le métabolisme des acides biliaires, pour, à terme, permettre une meilleure prise en charge des patients et le développement de nouvelles pistes physiopathologique et des stratégies thérapeutiques originales. L'apport de la spectrométrie de masse dans le laboratoire et l'environnement hospitalier, permettait d'envisager de répondre aux questions.

Par souci de clarté dans la mise en perspective de ces travaux de recherche, il me faut ici reprendre chaque étude séparément et mettre en exergue certains fondamentaux de la discussion avant de tenter une discussion plus générale.

la dysbiose marqueur prédictif de récurrence

Dans la première étude cherchant à explorer les valeurs prédictives de la dysbiose, nous avons confirmé l'existence d'une dysbiose au cours de la MC centrée sur un déficit en *Firmicutes*. Le travail a été réalisé au sein de l'étude STORI, destinée à répondre à la quête précise de facteurs prédictifs de rechute au cours de la MC. La force de cette étude réside dans sa réalisation dans 20 centres de manière prospective avec un nombre important de patients inclus et surtout bien phénotypés. Nous n'étions pas en mesure d'étendre l'analyse du microbiote à l'ensemble de la population de l'étude STORI en raison d'un manque d'échantillons. Ainsi, nous avons limité ce travail à un sous-groupe de patients. Cependant, en examinant ce sous-groupe de patients, leurs caractéristiques semblent être similaires à ceux de STORI. En outre, la courbe de Kaplan-Meier de suivi sans rechute semble être similaire à la courbe de l'étude STORI (1). Ainsi, les informations recueillies à partir de ce sous-groupe semblent valides. Nous avons décidé de concentrer notre analyse sur la composition bactérienne du compartiment fécal pour des raisons de faisabilité et nous n'avons donc pas pu analyser les bactéries associées à la muqueuse. Toutefois, le microbiote fécal reste informatif pour l'analyse de la structure de la communauté bactérienne (87). Bien que l'échantillonnage ait été effectué dans 20 centres en France et en Belgique, la quantification du nombre de bactéries total de chaque échantillon ne diffère pas des échantillons des sujets contrôles prélevés dans un seul centre. Cela indique que la qualité de la conservation de l'échantillon, de la collecte à l'expédition au laboratoire centralisé, était adéquate. Pour tous les échantillons, l'extraction et l'analyse de l'ADN ont été centralisées au laboratoire et la technique de PCR quantitative a pu identifier les principales différences dans la structure de la communauté microbienne. Les résultats n'ont été obtenus qu'avec une seule technique car trop peu de matériel restant était disponible pour une deuxième technique comme le séquençage. Cependant, la réalisation de statistiques solides à l'aide d'un expert nous a permis de conforter les résultats obtenus et éliminer tous les biais possibles. Cette idée a été confortée par le fait que l'ensemble du travail réalisé en amont a permis de publier notre article sans reviewing. Notre

étude a révélé des différences entre les futurs rechuteurs et les non rechuteurs à l'inclusion et de légers changements dans chaque groupe au fil du temps. Ceci suggère que l'analyse de la structure du microbiote peut distinguer deux populations de patients qui vont évoluer dans l'année soit vers rechute soit vers une rémission stable. Nous savons que dans les groupes bactériens et les espèces, nos techniques ne permettent pas la discrimination de pathovars particuliers, comme *A/EC*, qui a été spécifiquement associé à la muqueuse iléale de patients atteints de MC (88). Cependant, comme certains groupes bactériens sont restés stables au cours du temps, en particulier le nombre total de bactéries, nous sommes confiants dans les changements observés des groupes bactériens dans notre étude. D'autre part une autre étude a également observé ces modification au cours de la RCH ce qui conforte nos résultats (183). Dans notre travail, la dysbiose, caractérisée notamment par la diminution de *F. prausnitzii* dès le début, était plus sévère chez les rechuteurs, ce qui suggère que le manque de *F. prausnitzii* était en mesure de prédire la rechute chez les patients atteints de MC. Une bonne valeur prédictive de rechute a été trouvée pour le groupe bactérien *C. coccoides* et l'espèce *F. prausnitzii* avec une bonne sensibilité et spécificité. On peut soutenir que la dysbiose pourrait apparaître comme un marqueur de l'inflammation latente et l'on pourrait supposer que dans les MICI, la dysbiose précède l'inflammation intestinale.

Modification des acides biliaires et conséquence au cours de la dysbiose

Dans la deuxième étude, nous avons recherché les liens entre le microbiote intestinal et le métabolisme des AB dans les MICI, comme un concept global. Nous avons démontré que la dysbiose associée aux MICI conduit à une altération du métabolisme des AB caractérisé par un défaut dans la déconjugaison, la déshydroxylation et la désulfatation. De plus, nous avons démontré que ce dysmétabolisme des AB dans la lumière intestinale pourrait renforcer la réponse inflammatoire de l'épithélium intestinal, et ainsi, aggraver la MICI. Nous avons exclu les patients présentant des anomalies des tests hépatiques ou ayant une maladie hépatique connue pour éviter des perturbations basales de la biosynthèse des AB, qui peut être observé, par exemple, dans les maladies cholestatiques, comme la cholangite sclérosante primitive (souvent associée aux MICI) (166, 167). L'iléon distal étant le site de réabsorption des AB, (168-170) les patients atteints de MC iléale ont été exclus de principe. Nous avons utilisé la spectrométrie de masse (HPLC MS / MS) pour mesurer les AB provenant du contenu fécale. Après avoir examiné ces données et la composition du microbiote fécal, nous avons généré des hypothèses reliant la dysbiose associé aux MICI et le métabolisme des AB. Nous avons ensuite effectué plusieurs expériences dans le but de mettre en évidence une connexion directe entre le microbiote intestinal et la biotransformation des AB. La déconjugaison et la déshydroxylation des AB dépendent de l'activité du microbiote intestinal. Une

diminution de l'activité BSH portée par certaines bactéries pourrait être impliquée dans l'augmentation dans des AB conjugués dans les fèces. Bien que l'on ne puisse pas exclure le rôle de la diminution globale du microbiote intestinal, nos résultats indiquent clairement que la baisse des bactéries totales est principalement due à un manque de *Firmicutes*. Parmi toutes les bactéries de l'intestin, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont les bactéries ayant la plus forte activité de déconjugaison (171, 172). Bien qu'il existe une redondance enzymatique dans la déconjugaison des AB, la mesure de l'activité métabolique des échantillons de selles provenant de patients atteints de MICI a permis de démontrer l'altération de la fonction, en particulier au cours d'une maladie active. In vivo, la transformation des AB dépend de plusieurs souches bactériennes formant une chaîne métabolique (173) et la déconjugaison des AB représente une étape limitante de la voie de biotransformation des AB (117, 174). L'expérience sur les souris axéniques a révélé la perte de cette fonction observée chez les patients MICI démontrant une augmentation des AB primaires, conjugués et sulfatés. En regardant les résultats chez nos patients, nous avons trouvé des AB primaires et secondaires sulfatés. Un changement dans le profil des AB avec des taux élevés d'AB primaires ne peut pas expliquer l'excès de sulfatation. Pour répondre à cette question, nous avons effectué une analyse de l'activité sulfatase qui a révélé une diminution de l'activité dans les selles de patients atteints de MICI. La forte proportion d'AB 3-OH-sulfatée dans les fèces des souris axéniques soutient l'idée d'une production d'AB 3-OH-sulfaté dans la paroi intestinale, avec l'expression intestinale de sulphotransférase par les cellules intestinales humaines (175, 177). D'autres altérations de la sulfatation peuvent être évoquées in vivo. Il est bien connu que les bactéries de l'intestin, telles que *Bacteroides* et *Clostridium*, portent une activité sulfatase, au moins au niveau génomique (184, 185). Toutefois, on en sait peu sur l'activité de sulfatase, capable de séparer le groupe 3-OH-sulfonate de l'AB, dans l'intestin en raison de difficultés de manipulation de bactéries anaérobies strictes. Les bactéries intestinales peuvent moduler l'activité intestinale de sulfotransférase (sulfatation des AB) par des modulines qui interfèrent localement avec les cellules épithéliales iléales ou colonocytes (178). En outre, le microbiote intestinal pourrait déclencher la biosynthèse globale des AB et en particulier les AB-3-OH-sulfaté, par l'intermédiaire de l'axe intestin-foie grâce à la régulation des récepteurs nucléaires, comme FXR, exprimé dans les cellules épithéliales de l'iléon (179) ou de récepteurs membranaires, comme TGR5 (123, 124). TGR5 est surtout activé par les AB secondaires, y compris le LCA et le DCA. Par conséquent, il est important de noter que chez l'homme, le plus puissant activateur du récepteur anti-inflammatoire TGR5 est produit par la flore intestinale. L'effet anti-inflammatoire du LCA a déjà été décrit (186). Nous avons conçu les expériences in vitro en utilisant les cellules Caco-2 pour modéliser et comprendre si une proportion inférieure d'AB secondaires dans les selles pourrait influencer sur les voies de l'inflammation dans la muqueuse colique.

Ce travail confirme que les AB secondaires (LCA et DCA) peuvent exercer des effets anti-inflammatoires sur les cellules épithéliales du côlon humain indépendamment de tout effet cytotoxique. Fait intéressant, cet effet a été perdu après 3-OH-sulfatation. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que les propriétés anti-inflammatoires des AB secondaires sur cellules Caco-2 pourraient dépendre TGR5. Enfin, une nouvelle description de la dysmétabolose des AB au cours des MICI a été récemment présentée avec un déficit en isomérisation des AB. Ce déficit est probablement directement en lien avec le dysbiose. Compte tenu de l'activité d'isomérisation des AB portée par les bactéries de la famille des *Clostridiaceae*. Cette isomérisation modifie les AB en une forme iso entraînant un changement dans leurs propriétés physico-chimiques et dans leurs fonctions. Ces modifications pourrait conduire à un entretien de l'inflammation intestinale (Bazin et al résumé JFHOD p175). Ce deuxième travail établit un lien crédible entre la perturbation de la composition du microbiote intestinal et les résultats cliniques. À la lumière de cette étude, les AB semblent être un nouvel acteur dans les MICI, participant au «cercle vicieux» pro-inflammatoire entre le microbiote intestinal et l'hôte.

Les peptides antimicrobiens aux cours des MICI

Dans la troisième étude, nous avons recherché les liens entre le microbiote intestinal et les PAM dans les MICI. Ce travail souffre des mêmes critiques que le précédent car il s'inscrit dans la génération d'un concept global permettant d'émettre d'hypothèses mécanistiques, sans en apporter toutes les réponses. Dans cette étude, la mise au point du dosage des PAM dans les selles par HPLC-MS/MS a permis d'aborder de manière originale l'étude des PAM aux cours des MICI. Les PAM dans les MICI ont jusqu'à présent été étudiés sur des biopsies avec réalisation soit de RT-PCR soit d'immunohistochimie. La quantification de PAM dans les selles des patients atteints de MICI a permis de montrer une différence de profil de sécrétion par rapport aux sujets sains. Les patients sélectionnés présentaient une maladie inflammatoire colique pure permettant de s'affranchir des modifications de l'écosystème lié à une atteinte de l'iléon distale, comme la variation de certaines défensines ou la modification des AB. La β défensine hBD1 est exprimée de manière constitutive par l'épithélium intestinal mais il a déjà été montré que dans les zones inflammatoires des patients atteints de MICI, par RT-PCR et immunohistochimie, que l'expression de hBD1 est significativement diminuée (181). Cette diminution n'avait pas été rapportée dans les zones non inflammatoires et était attribuée à une perte de cellules épithéliales plutôt qu'à un processus régulé. L'étude sur les cellules CaCo-2 n'a pas montré de variation de l'expression de hBD1 sous l'effet des stimuli par différentes cytokines pro-inflammatoires. Dans notre étude, la sécrétion de hBD1 a été analysée dans sa globalité sans différenciation des zones du tractus digestif, et une diminution a été observée chez

les patients en rémission. La régulation de la sécrétion pourrait être modulée par des processus non liés à l'inflammation. L'étude de *Peyrin-Biroulet et al* évoque un mécanisme auto-entretenu de déficit en hBD1 via le récepteur nucléaire PPAR γ (187). Ce récepteur est lié au microbiote par le récepteur membranaire TLR4. L'hypothèse d'une diminution d'activation de PPAR γ , et donc de la diminution de hBD1, par un mécanisme direct ou indirect lié à la dysbiose est à évoquer. L'étude réalisée *in vitro* sur différents modèles de cellules épithéliales n'a pas permis de retrouver une stimulation de l'expression de hBD1 par la mise en contact de surnageants bactériens de la flore commensale. Le mécanisme indirect de stimulation par les acides biliaires n'a pas été confirmé. Bien qu'aucune stimulation n'ait été mise en évidence dans ce modèle cellulaire d'une défensine constitutive, les AB sont déjà connus pour réguler la production de PAM au niveau de l'épithélium biliaire via le récepteur VDR couplé à FXR (188). La dérégulation de la sécrétion d'autres PAM au niveau de l'épithélium intestinal par une dysmétabolose des AB au cours des MICI reste donc une hypothèse. Par ailleurs, l'absence de stimulation par l'eau fécale des patients atteints de MICI contrairement aux sujets sains, nous laisse penser qu'un mécanisme indirect de régulation est possiblement impliqué. Au cours de cette étude, nous avons également constaté une nette diminution de l' α -défensine HD5, normalement exprimée de manière constitutive par les cellules de Paneth, chez les patients en poussée comme en rémission atteints de MC comme de RCH. Cette diminution a été mise en évidence localement chez les patients ayant une atteinte iléale de MC et rapportée d'une part comme une conséquence de l'inflammation, entraînant une réduction du nombre de cellules de Paneth, et d'autre part aggravée par la présence d'une mutation NOD2 (112). HD5 n'a jamais été dosé dans les selles de ces patients en l'absence d'atteinte iléale ni chez les patients atteints de RCH. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous pour tenter d'expliquer cette diminution : le peptide sécrété peut être soit en partie sous forme immature comme l'étude de *Elphick et al* le suggère et donc non détecté par la spectrométrie de masse (182). Soit ce peptide est dénaturé et de ce fait plus sensible à la dégradation enzymatique par l'absence de ponts disulfures. La dysbiose observée pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'expression de la défensine HD5. Ces différentes hypothèses se doivent d'être explorées par la réalisation de prélèvements iléaux. La dysbiose observée au cours des MICI pourrait ainsi jouer un rôle dans l'inflammation chronique intestinale par son impact sur la sécrétion des PAM. Inversement la dysbiose pourrait être auto-entretenu par un déficit en PAM, et entretenir une inflammation chronique intestinale au cours des MICI. Une étude des spectres de l'activité des PAM sur les bactéries commensales a été effectuée dans cette hypothèse. La concentration de hBD1 utilisée (0.5mg/ml) n'inhibe pas la croissance de *F. prausnitzii* mais inhibe la croissance d'*E. coli*. L'originalité et l'atout de cette étude a été la réalisation de peptidogrammes avec la recherche du spectre d'activité de formes actives de défensines oxydée comme réduite,

permettant d'intégrer l'activité après réduction des ponts disulfures. Nos résultats suggèrent que l'altération de l'expression de hBD1 est une caractéristique primaire dans les MICI qui peut perpétuer la dysbiose associée aux MICI. Cette altération est possiblement liée à des conditions locales au niveau de l'épithélium intestinal associé à des facteurs génétiques favorisant. Ces résultats permettent de soulever de nouvelles hypothèses et pistes de recherches plus fondamentales, notamment au niveau des conditions locales épithéliales et de l'écosystème associé à la muqueuse.

Discussion générale et perspectives

Ces trois études nous ont permis de confirmer le rôle central de la dysbiose associée aux MICI : d'une part comme outil potentiellement prédictif de rechute, précédant une inflammation locale ou systémique, d'autre part comme acteur dans l'apparition ou l'entretien d'un déséquilibre de l'écosystème intestinal. Ces travaux se sont posés initialement avec les interrogations d'un clinicien passant de la recherche pré-clinique à la recherche plus fondamentale. Ce point de vue a permis de baser ces hypothèses et questionnements en relation directe avec le patient mais souffre de créer plus d'hypothèses mécanistiques que d'apporter de réponses concrètes. Ces travaux portant sur les AB et les PAM soulèvent de nouvelles questions qui ne pourront être résolues que par des études plus fondamentales. L'exploration à l'aide de modèles animaux pourrait permettre de mieux caractériser les mécanismes mis en jeu, comme l'implication de TGR5 ou de FXR au cours de la dysmétabolose des AB ou encore l'expression de PAM dans un modèle animal au cours d'une dysbiose associée aux MICI. L'analyse de prélèvements intestinaux pourrait également permettre de préciser les interactions avec la muqueuse, afin d'affiner les hypothèses et répondre aux mécanismes physiopathologiques impliqués. L'étude des voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'inflammation pourraient permettre d'approfondir les connaissances de la physiopathologie des MICI et développer des stratégies thérapeutiques originales. Ce développement d'une recherche plus approfondie du microbiote et son écosystème devrait également permettre d'obtenir de nouveaux biomarqueurs. La première étude plaçant le microbiote comme biomarqueur de rechute est une ouverture vers la recherche de produits bactériens ou de modifications de l'écosystème chez les patients atteints de MICI. En effet, même si les valeurs obtenues de sensibilité et de valeur prédictive positive sont prometteuses, la variabilité du microbiote et la mise en place en routine de cette technique semblent deux freins majeurs. La découverte de biomarqueurs plus stables et plus spécifiques en lien avec cette dysbiose spécifique est une voie de recherche à poursuivre. L'exploration et la discrimination de pathovars particuliers par les nouvelles techniques de séquençages, comme marqueurs prédictif, pourrait également être une voie de recherche. Ces

éléments sont autant de nouvelles pistes pour le développement de meilleurs outils, afin d'offrir aux patients une prise en charge optimale des MICI.

ANNEXES

Rôle du microbiote au cours des maladies inflammatoires intestinales : connaissances actuelles et perspectives

Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases: current knowledge and prospects

Élodie Quévrain^{*,**}, Philippe Seksik^{*,**,*}, Sylvie Rajca^{*,**,*}



* ERL Inserm 1057 micro-organismes, molécules bioactives et physiopathologie intestinale, Paris.

** UMR 7203 UPMC / CNRS / ENS, laboratoire des biomolécules.

*** APHP, hôpital Saint-Antoine, service de gastroentérologie et nutrition, Paris.

Le microbiote intestinal constitue un écosystème complexe dont l'impact sur la santé de l'homme est aujourd'hui reconnu. Il contribue à la fermentation des sucres et des protéines et au métabolisme de nombreuses molécules telles que les acides biliaires et les xénobiotiques. Le microbiote participe également à la maturation du système immunitaire et joue un véritable rôle de barrière protectrice de l'épithélium intestinal contre l'infection par des micro-organismes pathogènes. Ces dernières années, l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie des maladies

inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) a été mise en évidence.

Le microbiote intestinal au cours des MICI

Des études moléculaires, indépendantes des méthodes de culture microbiologique, fondées pour la plupart sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, ont permis de mettre en évidence certaines anomalies du microbiote intestinal au cours des MICI. Ces anomalies sont (i) une forte instabilité du microbiote au cours du temps, (ii) la présence d'environ 30 % de bactéries inhabituelles, (iii) une restriction de la biodiversité généralement aux dépens du phylum des Firmicutes, et (iv) une augmentation de la concentration bactérienne muqueuse (1). Chez les patients atteints de MICI, la présence d'un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal, ou dysbiose, a été mise en évidence. Une analyse statistique en composantes principales, prenant en compte la composition en espèces bactériennes du microbiote fécal, montre bien que les sujets atteints de MICI, même lorsqu'ils sont en rémission, ont un profil de flore différent de celui des sujets sains (présence de 2 populations distinctes) [figure 1]. La dysbiose pourrait participer à l'activation chronique et inappropriée du système immunitaire intestinal et conduire au phénomène inflammatoire. Cette dysbiose est caractérisée par un déficit en certaines bactéries, telles que *Faecalibacte-*

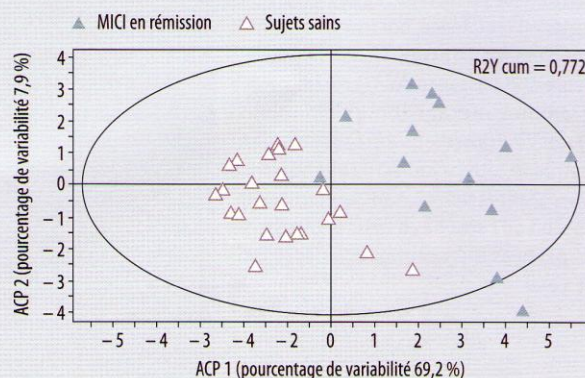


Figure 1. Analyse en composantes principales (ACP) du microbiote fécal de sujets sains et de sujets atteints de MICI en rémission (2).

Points forts⁺

- » La dysbiose au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se traduit par une perte en espèces bactériennes symbiotiques.
- » Cette dysbiose a un impact sur la physiologie de l'épithélium intestinal.
- » L'effet d'une dysbiose peut être médié par des modifications du contenu luminal : mucus, acides biliaires, peptides antimicrobiens, molécules du *quorum sensing*...
- » La dysbiose pourrait avoir un intérêt pronostic car elle semble précéder l'inflammation intestinale.

Mots-clés

MICI
Microbiote
Dysbiose
Défensines
Acides biliaires
Quorum sensing

rium prausnitzii, du groupe *Clostridium leptum*, mais aussi par une augmentation de certains pathogènes tels que *Escherichia coli* AIEC ou *Mycobacterium avium paratuberculosis* (2). La perte de *F. prausnitzii* associée au développement d'une MICI a suggéré le rôle anti-inflammatoire de cette bactérie. Cela a pu être vérifié sur des modèles cellulaires et animaux (3). L'identification de la ou des molécules responsables de cette activité anti-inflammatoire fait l'objet de recherches approfondies.

Les acteurs de l'écosystème microbien intestinal au cours des MICI

L'impact de la dysbiose sur la physiologie de l'épithélium intestinal peut être médié par la biotransformation et la modulation de molécules présentes dans la lumière intestinale. Parmi ces molécules d'intérêt, on s'attachera ici aux peptides antimicrobiens, aux acides biliaires, au mucus ou encore aux molécules impliquées dans la communication bactérienne.

Les défensines

Les défensines, peptides antimicrobiens participant à l'immunité innée, s'imposent parmi les acteurs de l'écosystème microbien intestinal, par leur propriétés bactéricides et immunomodulatrices. Les défensines sont des peptides cationiques amphiphiles de 30 à 40 acides aminés. Du fait de leurs caractéristiques physicochimiques, leur spectre d'activité antimicrobienne est très large, incluant les bactéries Gram+ et Gram-, les mycobactéries, les virus, les parasites et les levures. Leur mode d'action antibactérien repose sur la rupture de la membrane externe par interaction avec les phospholipides chargés négativement. Les défensines ont également une action de type chimiotactique sur certaines cellules de la muqueuse intestinale (lymphocytes, cellules dendritiques, etc.) [4]. Les défensines se divisent en 2 sous-groupes chez l'homme : les α - et les β -défensines. Il existe 6 α -défensines : HNP1 à 4, HD5 et HD6. Les défensines HD5 et 6, présentes principalement dans le tube digestif humain, sont sécrétées par les cellules

de Paneth, situées à la base des cryptes de l'intestin grêle et dans le côlon (métaplasie Paneth-like). Les β -défensines sont sécrétées majoritairement par les cellules épithéliales. Il existe 6 β -défensines : hBD1 à 6. Leur spectre d'activité est plus axé contre les bactéries Gram- et les levures que celui des α -défensines et elles montrent moins d'efficacité sur les bactéries Gram+.

Certains travaux ont mis en évidence une défaillance de la barrière intestinale, dont un déficit en défensines au cours de la maladie de Crohn (MC). En effet, l'expression iléale des α -défensines, notamment de HD5, est diminuée chez les patients atteints de MC iléale, et ce d'autant plus en cas de mutation du gène NOD2 (5). Un déficit en hBD1, β -défensine synthétisée par les colonocytes, est incriminé dans la physiopathologie des MICI (6). L'expression de la β -défensine hBD2 est faiblement induite chez les patients ayant une MC colique, par rapport aux patients atteints de rectocolite hémorragique, comme s'il y avait un défaut d'induction de la synthèse de cette défensine colique au cours de la MC (7). L'accumulation d'altérations de la barrière muqueuse intestinale, comme la diminution de la production de défensines, pourrait être responsable de la dysbiose observée au cours de la MC.

Les acides biliaires

Les acides biliaires (AB) contenus dans la bile sont formés à partir d'un noyau cholestérol et possèdent une face hydrophile et une face hydrophobe. Cette propriété permet la solubilisation des lipides sous forme de micelles et constitue, d'autre part, une voie d'élimination de déchets endogènes ou exogènes insolubles dans l'eau (8). La synthèse hépatique aboutit à la formation d'AB primaires. Dans l'iléon, sous l'action des bactéries intestinales, les AB vont être déconjugués par des enzymes appartenant à la classe des hydrolases, enzymes présentes chez plusieurs espèces bactériennes comme *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* ou encore *Bacteroides fragilis* (9). Une fois déconjugués, les AB sont transformés en AB secondaires grâce aux enzymes bactériennes

Highlights

- » Dysbiosis in inflammatory bowel diseases is characterized by a loss of symbiotic bacterial species.
- » Dysbiosis impacts on the physiology of the intestinal epithelium.
- » Effects of dysbiosis may rely on changes in luminal contents: mucus, bile acids, antimicrobial peptides, quorum sensing signaling molecules...
- » Because dysbiosis seems to precede intestinal inflammation, it could be used as a prognostic tool.

Keywords

IBD
Microbiota
Dysbiosis
Defensins
Bile salts
Quorum sensing

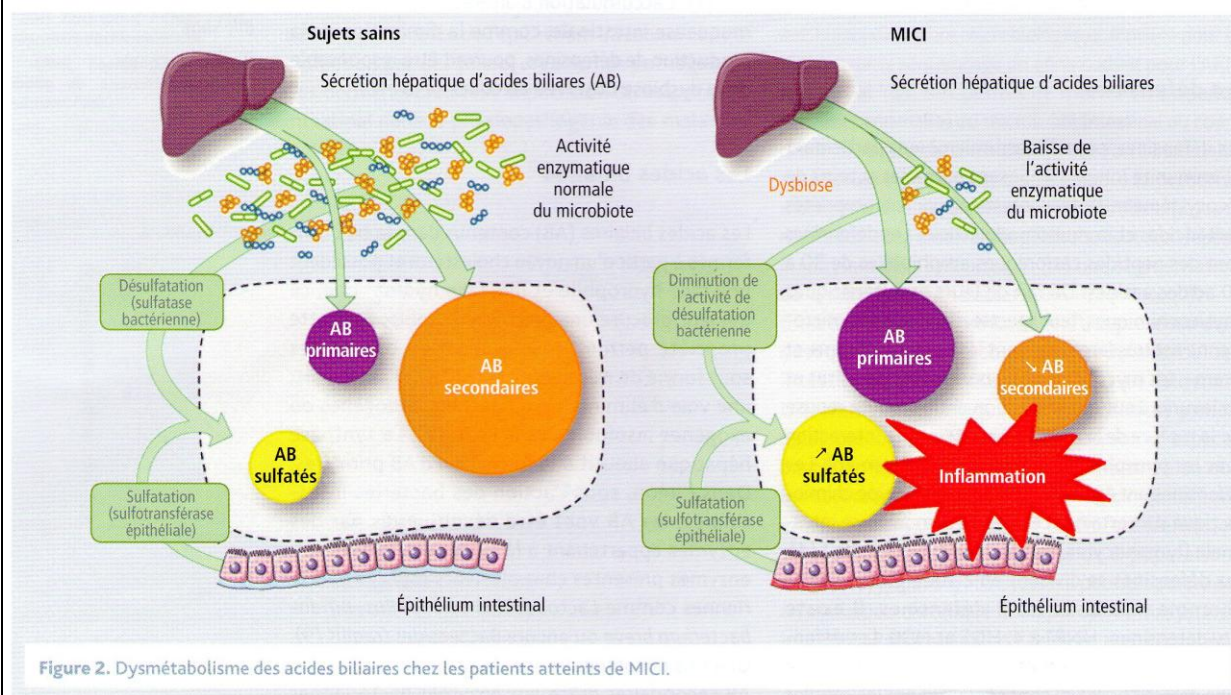
(hydroxystéroïdes deshydrogénases), ce qui permet leur réabsorption. Une petite partie des acides biliaires va soit être transformée en AB "tertiaires" par réoxydation soit être sulfatée pour être éliminée dans les selles. Ainsi, dans les selles, le pool d'AB est constitué par des AB secondaires (65 %) et déconjugués (25 %). On observe également des AB sulfatés (< 5 %) provenant de la désulfuration (sulfatase bactérienne) après sulfatation par l'épithélium intestinal.

Chez les patients atteints de MICI, des anomalies du profil des AB dans les selles correspondant à un déficit de déconjugaison, de transformation et de désulfatation des AB par le microbiote ont été observées (figure 2) [10]. Ces résultats suggèrent une relation entre la dysbiose et le dysmétabolisme des AB au cours des MICI. Ces modifications du pool d'AB ont une action de promotion de l'inflammation sur des modèles cellulaires (10).

Les molécules impliquées dans la communication bactérienne

Au sein d'un écosystème, les populations bactériennes communiquent entre elles en produisant et détectant de petites molécules diffusibles. Parmi ces

modes de communication, on retrouve le *quorum sensing* de type I, impliquant la production d'acyl-homosérine lactones (AHL). Ces molécules sont connues pour réguler l'expression de nombreux gènes bactériens tels que ceux impliqués dans la virulence, la production de molécules antimicrobiennes ou encore la formation de biofilms. Bien que largement étudié dans d'autres écosystèmes bactériens, le *quorum sensing* de type I n'a fait l'objet que de quelques descriptions chez des pathogènes et entérobactéries dans l'écosystème intestinal humain. Des arguments expérimentaux indirects suggèrent que ce type de *quorum sensing* pourrait être impliqué dans les MICI. En effet, il a été récemment observé que la paraoxonase 1 (PON-1), une enzyme extracellulaire de l'épithélium digestif, possède une activité d'hydrolyse des AHL (*quenching* du QS). Ces travaux ont montré que l'activité de l'enzyme PON-1 est significativement diminuée chez les patients présentant une MICI active par rapport à des sujets sains (11), et que le polymorphisme de PON-1 (allèle 192R), conduisant à une plus forte activité paraoxonase, est moins fréquent chez les patients atteints de MICI que chez les sujets sains (12). Au cours des MICI, l'augmentation de la biodisponibilité des AHL pourrait ainsi être impliquée dans l'expansion de certaines entérobactéries et participerait au maintien de la dysbiose.



Le mucus

Le mucus joue également un rôle dans la protection contre l'inflammation. Les cellules intestinales à mucus sécrètent, en grande quantité, des protéines hautement glycosylées qui forment une double couche de mucus (13). La couche la plus interne, proche de l'épithélium, contient des peptides antimicrobiens alors que la couche externe de mucus est colonisée par le microbiote intestinal et est le siège du clivage protéolytique de la mucine Muc2. Il a été précédemment montré que des animaux déficients en Muc2 étaient plus susceptibles à l'inflammation intestinale et au processus tumoral, ce qui souligne l'importance de la couche de mucus dans la réduction de l'adhérence bactérienne aux cellules intestinales. Récemment, une déficience en certains oligosaccharides composant le mucus, ceux présentant une liaison O-glucosidique, a été corrélée à l'apparition d'une colite spontanée chez la souris (14).

L'apport du microbiote intestinal en tant que marqueur prédictif des MICI

La dysbiose, un marqueur prédictif des MICI ?

La dysbiose paraît être un élément clé dans la physiopathologie des MICI. En comparant le profil du microbiote intestinal des MICI en rémission à celui de sujets en poussée par qPCR sur les selles des patients, on constate que la dysbiose, et particulièrement le déficit en *F. prausnitzii*, est plus prononcée (15). Ce résultat nous incite à penser qu'une dysbiose plus marquée pourrait être prédictive de rechute. Récemment, une étude microbiologique, effectuée sur la cohorte STORI du GETAID, a permis de mettre en évidence la dysbiose associée à la MC comme facteur prédictif de récurrence clinique après arrêt du traitement par infliximab au cours d'une MC bien contrôlée (16). Ces travaux mettent en évidence une dysbiose au cours de la MC plus marquée chez les futurs rechuteurs avant même l'arrêt du traitement par infliximab. La quantité de bactéries appartenant aux groupes *Clostridium coccoides* et *Bacteroides* (et apparentées) ainsi que la prévalence de l'espèce *F. prausnitzii* dans les selles permettent de discriminer les patients qui resteront en rémission de ceux qui rechuteront.

Développement de marqueurs plus simples que l'évaluation de la diversité bactérienne : gènes bactériens, peptides

La technique employée, par qPCR qui cible les gènes de l'ARN 16S, pour déterminer le profil du microbiote intestinal, reste difficile à utiliser comme test diagnostique de routine. À la lumière de ces résultats, le développement de marqueurs plus accessibles d'évaluation de la diversité bactérienne pourrait être utile. Le projet MetaHIT a récemment permis de caractériser l'ensemble du métagénome du microbiote intestinal par une nouvelle technique de séquençage (pyroséquençage) et a été appliqué aux MICI. Ce catalogue de plus de 3,3 millions de gènes bactériens paraît prometteur pour la découverte d'outils diagnostiques, voire pronostiques, dans les MICI (17, 18). D'autre part, les éléments de l'écosystème microbien tels que les molécules du *quorum sensing*, les acides biliaires ou les défensines pourraient constituer d'autres marqueurs indirects du microbiote au cours des MICI.

Le microbiote et les perspectives thérapeutiques

Les probiotiques et les prébiotiques

L'étude des prébiotiques et probiotiques est un domaine en pleine expansion : les cibles des prébiotiques et probiotiques peuvent être liées à la prévention et au traitement de pathologies du système gastro-intestinal. On a récemment proposé d'utiliser les pré- et probiotiques comme des agents thérapeutiques pour le traitement du syndrome de l'intestin irritable et des MICI. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, non pathogènes, qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, ont une influence positive sur la santé de l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal (19). Les prébiotiques, quant à eux, sont définis comme des ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries résidant dans le côlon, améliorant ainsi la santé de l'hôte (20).

Dans le cas de la rectocolite hémorragique, 2 essais cliniques ont montré un effet, équivalent à celui de la méسالazine, de la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 (21, 22). En ce qui concerne la MC, les preuves de l'efficacité des probiotiques pour la prévention des rechutes restent peu nombreuses et surtout contradictoires (tableau).

DOSSIER THÉMATIQUE

Flore intestinale et probiotiques

Rôle du microbiote au cours des maladies inflammatoires intestinales : connaissances actuelles et perspectives

Les bactéries recombinantes

La création de probiotiques génétiquement modifiés pour la production de nouvelles protéines ouvre de nouvelles voies thérapeutiques. Cette approche permettrait (i) de choisir la protéine à apporter dans l'écosystème intestinal, (ii) de choisir une éventuelle

sécrétion de cette protéine par le micro-organisme, (iii) de choisir les conditions nécessaires à cette sécrétion et (iv) d'obtenir des effets à long terme si le probiotique parvient à coloniser la niche écologique. Par exemple, Steidler et al. ont développé un modèle de *Lactococcus lactis* recombinant capable de libérer dans l'intestin une protéine aux propriétés immunomodulatrices, l'interleukine 10 (23).

Sur ce principe, un brevet a été déposé en 2010 sur l'utilisation d'une bactérie recombinante pour le traitement des MICI et du syndrome de l'intestin irritable (24). S'appuyant sur le rôle joué par les protéases dans le maintien de l'inflammation, ces auteurs ont montré que l'apport d'une antiprotéase, l'élafine, via une souche de *L. lactis* recombinante, pouvait diminuer les symptômes chez des souris présentant une colite induite au dextran sulfate de sodium. Parmi les perspectives thérapeutiques pour le traitement des MICI figure la restauration du contenu de la lumière intestinale. Le retour à une composition "normale" du microbiote intestinal pourrait être obtenu en régulant du *quorum sensing* afin de limiter la colonisation de la lumière et de la muqueuse intestinale par des bactéries opportunistes. Ce retour à la normobiose pourrait également être atteint en modulant les peptides antimicrobiens ou les AB contenus dans la lumière intestinale.

Conclusion

Le microbiote intestinal apparaît comme un élément clé dans la physiopathologie des MICI. La dysbiose per se témoigne d'une perte de bactéries anti-inflammatoires et libère une niche écologique qui peut être colonisée, de manière opportuniste, par des bactéries entraînant une pathogénicité de type inflammation chronique. Au-delà de cette action directe, le microbiote s'inscrit dans un écosystème complexe dont le bon fonctionnement permet le maintien de l'homéostasie intestinale. Au cours d'une dysbiose, une modification du contenu luminal (mucus, acides biliaires, molécules du *quorum sensing*, défenses, etc.) est observée et pourrait participer à la promotion d'une inflammation chronique (figure 3). Ces modifications de l'écosystème sont autant de pistes pour tenter de restaurer une normobiose. De fait, si l'utilisation des pro- et prébiotiques dans le champ des MICI reste à ce jour décevante, des perspectives d'approches thérapeutiques médiées par le microbiote demeurent une voie thérapeutique pertinente. Enfin, certaines données suggèrent que la dysbiose associée aux MICI pourrait précéder l'inflammation intestinale, faisant du microbiote un outil pronostique potentiel.

Tableau. Effets des probiotiques chez les malades atteints de MICI.

Pathologie/situation	Probiotique	Effet	Références
MC	<i>Lactobacillus GG</i>	CDAI ↓ Perm. intest. ↓	Gupta et al. (2000)
MC	<i>Lactobacillus GG</i>	Rechute = RPO =	Bousvaros et al. (2005) Prantera et al. (2002)
RCH	<i>Lactobacillus GG</i>	Pochite ↓	Gosselink et al. (2004)
MC	<i>Lactobacillus johnsonii LA1</i>	RPO = RPO =	Marteau et al. (2006) Van Gossum et al. (2007)
RCH	<i>E. coli Nissle 1917</i>	Rémission ↑	Kruis et al. (2004) Matthes et al. (2010)
MC	<i>E. coli Nissle 1917</i>	Rechute ↓	Malchow et al. (1997)
RCH	<i>Bifidobacteria</i>	Rémission ↑	Ishikawa et al. (2003)
MC	VSL#3	RPO ↓	Campieri et al. (2000)
Pochite réfractaire	VSL#3	Rémission ↑	Gionchetti et al. (2000) Mimura et al. (2004)
RCH	VSL#3	Rémission ↑	Sood et al. (2009) Tursi et al. (2010)
MC	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Rechute ↓	Guslandi et al. (2000)
RCH	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Rechute =	Guslandi et al. (2000)
MC	<i>Trichuris suis ova</i>	CDAI ↓	Summers et al. (2005a)
RCH	<i>Trichuris suis ova</i>	UCDAI ↓	Summers et al. (2005b)

MC : maladie de Crohn; RCH : rectocolite hémorragique; CDAI : Crohn's disease activity index; UCDAI : ulcerative colitis disease activity index; perm. intest. : perméabilité intestinale; RPO : récurrence post-opératoire; VSL#3 : combinaison de plusieurs souches probiotiques appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*.

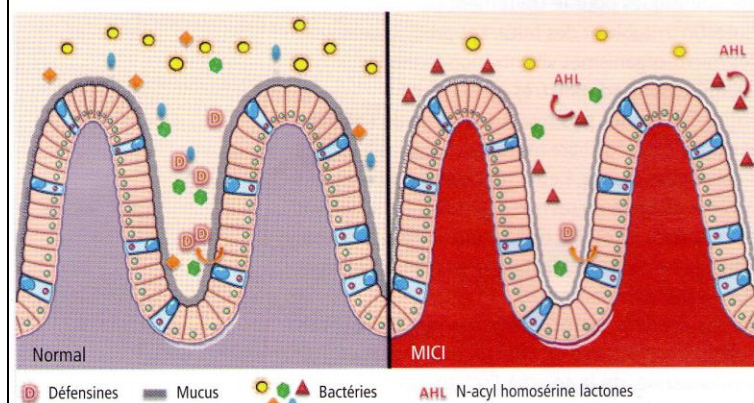


Figure 3. La dysbiose et les modifications du contenu luminal chez les patients atteints de MICI.

Références bibliographiques

1. Seksik P. Microbiote intestinale et MICI. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34:48-55.
2. Sokol H, Seksik P, Furet JP et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1183-9.
3. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16731-6.
4. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007;19:70-83.
5. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression. *Gut* 2004;53:1658-64.
6. Wehkamp J, Fellermann KR, Herringer S et al. Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:745-52.
7. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:215-23.
8. Hofmann AF. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol Sci* 1999;14:24-9.
9. Ridlon JM, Kang DJ and Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lip Res* 2006;47:241-59.
10. Duboc H, Rainteau D, Thomas G et al. La dysbiose au cours de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin: quelles conséquences sur le métabolisme des acides biliaires? *JFHOD* 2009;33(Suppl.1):A134.
11. Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K et al. Para-oxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:93-9.
12. Karban A, Hartman C, Eliakim R et al. Para-oxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007;52:2707-15.
13. Johansson ME, Phillipson M, Peterson J et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependant mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:15064-9.
14. Fu J, Wei B, Wen T et al. Loss of intestinal core-1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 2011;121:1657-66.
15. Machiels K, Joossens M, De Preter V et al. Association of *Faecalibacterium prausnitzii* and disease activity in ulcerative colitis. *DDW* 2011;140(Suppl.1):S-142 (abstract 860).
16. Rajca S, Grondin V, Louis E et al. Crohn's disease associated dysbiosis as a predictive factor of clinical relapse: a microbiological substudy of the GETAID-STORI Cohort. *Gastroenterology* 2011;140(Suppl.1):S-48.
17. Dusko E, Antolin M, Artiguenave F et al. Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34(Suppl.1):S23-8.
18. <http://www.metahit.eu/>, consulté le 09-06-2011.
19. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32:439-42.
20. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept prebiotic. *J Nutr* 1995;5:1401-12.
21. Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617-23.
22. Matthes H, Krummner T, Giensch M et al. Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement Altern Med* 2010;10:13.
23. Braat H, Rottiers P, Hommes DW et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:754-9.
24. Sallenave JM, Vergnolle N, Langella P et al. Recombinant probiotic bacteria for the prevention and treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD) and Irritable Bowel Syndrome (IBS). Patent application number EP10305045.6

Actualités recherche

rédigée par le Dr M. Chamillard, Inserm U801, CHRU Lille

Comment bloquer efficacement les phases précoces d'infection par le VHC?

Selon l'Organisation mondiale de la santé, le virus de l'hépatite C (VHC) infecte chaque année 3 à 4 millions de personnes. Cependant, aucun vaccin n'est disponible contre cette infection virale qui représente la cause majeure d'affection hépatique chronique, comme la cirrhose et le cancer du foie. À ces observations, s'ajoutent une extrême plasticité des souches virales et un traitement prohibitif des infections chroniques qui est inefficace chez plus de la moitié de ces patients. Une des stratégies thérapeutiques actuellement explorées consiste à prévenir l'entrée cellulaire de ce virus, mais il reste à dévoiler les mécanismes moléculaires exploités par le virus pour sa dissémination et sa persistance. Par leurs travaux récemment publiés dans *Nature Medicine*, le Pr Thomas Baumert (Inserm, université de Strasbourg) et ses collaborateurs européens et américains viennent d'impliquer 2 récepteurs à activité tyrosine kinase au cours du processus complexe d'entrée et de dissémination du VHC. Grâce à un criblage systématique, les auteurs de cette étude ont identifié le récepteur au facteur de croissance épithéliale (EGFR) et celui à l'éphrine A1 (EphA2) comme des acteurs clés de l'entrée virale. Ces résultats ont été validés in vitro sur des modèles de lignées cellulaires et de cultures primaires d'hépatocytes en combinant l'utilisation d'anticorps, d'antagonistes (erlotinib et dasatinib) et d'agonistes de ces récepteurs. Les données de cette étude ont également permis de préciser que ces 2 récepteurs participent aux étapes d'entrée et de dissémination virale en modulant l'association de la claudine 1 et de CD81 in vitro. Enfin, le traitement par l'erlotinib a démontré une efficacité et une tolérabilité dans un modèle expérimental d'infection par le VHC chez la souris.

Commentaire

Nous sommes désormais dans l'attente des résultats de l'essai clinique avec l'erlotinib qui est d'ores et déjà en prévision et qui a montré son efficacité contre le cancer bronchique non à petites cellules et plus modestement contre l'hépatocarcinome.

Référence bibliographique

Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17(5):589-95.

«L'IMPLICATION du microbiote intestinal dans la pathogénie des maladies inflammatoires de l'intestin »

PAR LES Dr SYLVIE RAJCA, PHILIPPE SEKSIK et ÉLODIE QUEVRAIN

Publié le 15 mars 2012 dans le quotidien du médecin

Introduction

Le microbiote intestinal constitue un écosystème complexe, composé d'environ 400 espèces différentes, dont le répertoire génomique représente 100 fois celui du génome humain. Il est indispensable au développement de l'hôte et contribue au métabolisme et à la maturation du système immunitaire. De plus, il joue un rôle de barrière protectrice de l'épithélium intestinal contre l'infection par des micro-organismes pathogènes.

Le microbiote intestinal au cours des MICI

L'implication du microbiote intestinal dans la pathogénie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) a été mise en évidence au cours de ces dernières années. Des études moléculaires, basées pour la plupart sur le séquençage des gènes codants pour les ARN ribosomiaux 16S, ont permis de montrer un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal, appelé dysbiose. Ces anomalies sont : (i) une instabilité du microbiote au cours du temps, (ii) la présence d'environ 30% de bactéries inhabituelles, (iii) une restriction de la biodiversité généralement aux dépens du phylum des Firmicutes avec un déficit en certaines bactéries, telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, et (iv) une augmentation de la concentration bactérienne muqueuse. Cette dysbiose persiste chez les sujets atteints de MICI en dehors même de périodes inflammatoires. Elle pourrait participer à l'activation chronique et inappropriée du système immunitaire intestinal.

Les probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, non pathogènes, qui lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, impactent positivement sur la santé de l'hôte. L'étude des probiotiques est un domaine en pleine expansion, ciblant la prévention et le traitement de pathologies du système gastro-intestinal, notamment dans le cadre des MICI.

Probiotiques et RCH

Les résultats des essais thérapeutiques au cours de la RCH sont résumés dans le tableau 1. Les études réalisées restent hétérogènes et ne permettent pas encore de généraliser les pratiques. Les résultats les plus probants ont été obtenus au cours de la pochite, une inflammation du réservoir iléal après coloproctectomie totale. Le probiotique VSL#3, contenant un mélange de plusieurs souches a prouvé son efficacité dans la prévention de la rechute au cours de plusieurs études.¹⁻⁵ Au cours de la RCH proprement dite, 3 essais testant *Escherichia coli* Nissle 1997 ont montré un effet équivalent à celui de la mesalazine en prévention de la rechute.⁶⁻⁸ *Lactobacillus rhamnosus* GG n'a pas montré d'efficacité dans le maintien en rémission.⁹⁻¹¹

Probiotiques et MC

Au cours de la maladie de Crohn (MC), les preuves de l'efficacité des probiotiques dans le maintien en rémission et de la prévention des rechutes en post opératoire, restent peu nombreuses et surtout contradictoires (tableau 2). L'essai mené avec le probiotique *Escherichia coli* Nissle 1917 était prometteur mais ces résultats n'ont jamais été confirmés par une étude plus robuste.¹² Les données obtenues avec *Saccharomyces boulardii* sont encourageantes mais restent à confirmer.^{13,14} Les probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* GG^{15,16} et *johnsonii* LA1¹⁷ n'ont par contre pas montré leur efficacité.

Perspectives

L'utilisation de probiotiques génétiquement modifiés pour la production de métabolites actifs¹⁸, la délivrance directe de métabolites actifs ou la restauration d'une « normobiose » sont des approches en cours de développement. Ces stratégies nécessitent de mieux connaître la dysbiose en jeu au cours de ces maladies à leurs différentes phases. Des progrès dans la connaissance de la régulation des populations bactériennes dans l'écosystème digestif *via* différents facteurs luminaux tels que le dialogue inter-bactérien

(quorum sensing), les peptides antimicrobiens, les acides biliaires sont un enjeu majeur. La modulation du microbiote intestinal à but thérapeutique devra donc s'adosser à une meilleure connaissance de cet écosystème et à son implication dans le contrôle des voies de l'inflammation.

Tableau 1. Efficacité des probiotiques dans les RCH.

Situation	Probiotique	Contrôle	n	Durée	Rechutes probiotique	Rechutes contrôle	p	références
Pochite réfractaire	<i>VSL#3</i>	Placebo	40	9 mois	15 %	100 %	< 0,05	1
Pochite réfractaire	<i>VSL#3</i>	Placebo	36	12 mois	15 %	94 %	< 0,05	2
AIA, prévention de pochite	<i>VSL#3</i>	Placebo	40	12 mois	10 %	40 %	< 0,05	3
RCH	<i>VSL#3</i>	Placebo	147	12 semaines			< 0,05	5
RCH	<i>VSL#3</i>	Placebo	144	8 semaines			< 0,05	4
Pochite	<i>L. rhamnosus GG</i>	Placebo	20	3 mois	PDAI = 8	PDAI = 8	NS	
AIA, prévention de pochite	<i>L. rhamnosus GG</i>	Cohorte historique					NS	
RCH	<i>E. coli Nissle 1917</i>	5-ASA 1,2 g/j	120	4 mois	16 %	11,3 %	NS	8
RCH	<i>E. coli Nissle 1917</i>	5-ASA 1,2 g/j	120	12 mois	67 %	73 %	NS	
RCH	<i>E. coli Nissle 1917</i>	5-ASA 1,5 g/j	327	12 mois	36,4 %	33 %	NS (équivalent)	6
RCH	<i>Bifidobacterium</i>	Placebo	21	12 mois	27 %	90 %	< 0,05	<i>Ishikawa H et al 2002</i>
RCH amélioration clinique	<i>Bifidobacterium+galacto oligosaccharide</i>	Placebo	41	12 mois			< 0,05	10
RCH amélioration clinique	<i>BIO-THREE</i>		20	4 semaines			< 0,05	11

RCH : rectocolite hémorragique – AIA : anastomose iléo-anale – 5-ASA : acide 5-aminosalicylique – PDAI : pouchitis disease activity index.

Tableau 2. Efficacité des probiotiques dans laMC.

Situation	Probiotique	Contrôle	n	Durée	Rechutes probiotique	Rechutes contrôle	p	références
MC	<i>S. boulardii</i> + 5-ASA	5-ASA seul	28	6 mois	6,3 %	37,5 %	< 0,05	13
MC	<i>S. boulardii</i> + 5-ASA	5-ASA seul	32	6 mois	6,25%	37,5%	< 0,05	14
MC	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Placebo	28	12 mois	30 %	70 %	< 0,05	12
MC postopératoire	<i>L. rhamnosus</i> GG	Placebo	45	12 mois	60 %	35 %	NS échec	15
MC maintien	<i>L. rhamnosus</i> GG	Placebo	75	24 mois	31 %	17 %	NS	16
MC postopératoire	<i>L. johnsonii</i> LA1	Placebo	98	6 mois	49 %	64 %	NS	17

MC : maladie de Crohn – AIA : anastomose iléo-anale – 5-ASA : acide 5-aminosalicylique – PDAI : pouchitis disease activity index.

Références

1. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305-9.
2. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, et al. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004;53:108-14.
3. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202-9.
4. Tursi A, Brandimarte G, Papa A, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2218-27.
5. Sood A, Midha V, Makharia GK, et al. The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1202-9, 9 e1.
6. Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617-23.
7. Matthes H, Krummenerl T, Giensch M, Wolff C, Schulze J. Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement Altern Med* 2010;10:13.
8. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635-9.
9. Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1567-74.
10. Ishikawa H, Matsumoto S, Ohashi Y, et al. Beneficial effects of probiotic bifidobacterium and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Digestion* 2011;84:128-33.
11. Tsuda Y, Yoshimatsu Y, Aoki H, et al. Clinical effectiveness of probiotics therapy (BIO-THREE) in patients with ulcerative colitis refractory to conventional therapy. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:1306-11.
12. Malchow HA. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 1997;25:653-8.
13. Plein K, Hotz J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study. *Z Gastroenterol* 1993;31:129-34.
14. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1462-4.
15. Prantera C, Scribano ML. Probiotics and Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2002;34 Suppl 2:S66-7.
16. Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN, et al. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:833-9.
17. Marteau P, Lemann M, Seksik P, et al. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 2006;55:842-7.
18. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:754-9.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect



Impact of the diagnosis and treatment of cancer on the course of inflammatory bowel disease



S. Rajca, P. Seksik, A. Bourrier, H. Sokol, I. Nion-Larmurier, L. Beaugerie, J. Cosnes*

Hôpital St Antoine & Université Paris VI, Paris, France

Received 3 December 2013; accepted 29 December 2013

KEYWORDS

Cancer;
Inflammatory bowel
disease (IBD);
Therapeutic management;
Immunomodulators

Abstract

Background: The effects of extra-intestinal cancer on the course of inflammatory bowel disease (IBD) are poorly understood.

Aim: To evaluate the impact of cancer and its management on IBD outcomes.

Methods: A total 80 IBD patients (51 Crohn's disease, 29 ulcerative colitis; 33 men, median age at cancer diagnosis 48 yrs) diagnosed with extra-intestinal cancer were selected from a prospective database. IBD activity and therapeutic requirements (assessed year-by-year) were compared before and after cancer diagnosis, with a control group of patients without cancer matched for gender, birth date, date of IBD diagnosis and IBD phenotype.

Results: Paired comparisons of the consecutive periods before and after cancer diagnosis did not show significant changes in median (IQR) percentages of years with active disease (27% [0–50] vs. 19% [0–53]), while the proportion of patient-years on any immunosuppressant remained stable (26% vs. 28%). Chemotherapy had no significant effect on IBD activity. Compared to controls, patients with cancer had a similar IBD activity and use of anti-TNF, but less use of immunomodulators (19% vs. 25%, $p < 0.001$) and an increased rate of surgery (4% vs. 2.5%, $p < 0.05$). Individual variations in IBD activity after cancer diagnosis were not significantly different in patients with cancer and their matched controls.

Conclusion: Occurrence of extra-intestinal cancer impacts IBD therapeutic management, with a trend towards less use of immunomodulators and more surgery. In the long-term, cancer diagnoses and treatments do not modify IBD outcomes.

© 2014 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Service de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital St-Antoine, 184 rue du Faubourg St-Antoine, 75571, Paris, France. Tel.: +33 1 49 28 31 70; fax: +33 1 49 28 31 88.

E-mail address: jacques.cosnes@sat.aphp.fr (J. Cosnes).

1. Introduction

Incidences of both inflammatory bowel disease (IBD) ¹ and cancer ² are increasing worldwide, and patients with IBD have an increased lifelong risk of intestinal and extra-intestinal malignancies.³ Associated IBD has a negative impact on the prognosis of extra-intestinal cancer independent of TNM staging.⁴ In a Danish population study, breast cancer patients with CD had a shorter survival compared to breast cancer patients without CD.⁵

Conversely, little is known about the evolution of IBD in patients diagnosed with malignancies. On one hand, oncologists usually recommend avoiding immunosuppression, taking into account the risk of relapse or the worsening of the cancer while on immunosuppressive drugs,^{6,7} yet at the present time approximately 50% of IBD patients are receiving immunomodulators or anti-TNF. In addition, cancer treatment may be associated with IBD reactivation.⁸ Moreover, extensive and metastatic cancers may worsen the course of IBD through activation of the inflammatory process.⁹ Thus, diagnosis and treatment of extra-intestinal cancer may have significant impacts both on the therapeutic strategies and IBD activity. The aim of the present study was to assess the long-term impacts of diagnoses of extra-intestinal cancer and cancer treatments on IBD outcomes.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Patients were enrolled from the MICISTA Registry, a clinical database of all patients with IBD evaluated by the same staff of physicians at St Antoine Hospital from 1975 to the present. This database included 7158 patients as of December 2011. Data were collected retrospectively before 1995 and prospectively afterwards. A history of cancer or current cancer was specifically noted in the database.¹⁰ Patients with diagnoses of extra-intestinal cancer between 1990 and 2009 were selected. Exclusion criteria were a history of intestinal cancer, a follow-up duration below 6 months after cancer diagnosis, skin cancer in patients older than 90-years old, loss to follow up before 1995, and cancer in remission for more than 10 years at the date of IBD diagnosis.

Selected cancer patients were anonymously matched in a 1/3 ratio to 240 patients without cancer (1/3) that constituted a control group. Matching criteria were as follows: gender, birth date (in windows of 5 years), calendar year of diagnosis (windows of 5 years), and disease phenotype (ulcerative colitis [UC] or Crohn's disease [CD]).

2.2. Evaluation of disease evolution

IBD activity was assessed year-by-year by analysing the occurrence of flare-ups, hospitalisation, or abdominal surgery. This was codified prospectively at each visit or hospitalisation for every calendar year according to a pre-established gradation from 0 to 5.¹⁰ Each patient-year was considered as active (activity score >1) if a flare-up requiring a therapeutic modification or a complication occurred during the year, or in the case of chronic active

disease, and inactive in the other cases (activity score <2). Flares and hospitalisations were taken into account only when symptoms were related to active IBD and not therapy-related or cancer-related. Similarly, only intestinal surgical procedures performed for IBD or IBD-related complications were taken into account and codified in the hospitalisation group. Restorative procedures performed in a patient with inactive disease were not included in the grading. Disease evolution was assessed using the same criteria in matched controls, considering a caesura date corresponding to the date of cancer diagnosis of the index case.

2.3. Treatment

The principles for the treatment of CD and UC in our unit have been detailed elsewhere.¹⁰ Briefly, disease flares were treated with mesalamine, steroids, or (after 1999) anti-TNF. Maintenance therapy used aminosalicylates, immunomodulators (azathioprine [AZA] as first line drugs, methotrexate in patients unresponsive or intolerant to AZA, or anti-TNF, according to clinical severity. The overall strategy remained mostly unchanged over time; however, there was a distinct tendency to initiate immunosuppressants earlier in the disease course after 1990.¹¹ Surgery was performed for stenotic complications, extra-parietal complications, neoplasia or intractable forms of CD or UC after well-conducted medical management. In patients with cancer, maintenance and type of immunosuppressants were discussed with the oncologist or the related specialty consultant.

The maximum treatment received by one patient during each calendar year was codified prospectively at each visit or hospitalisation, according to a pre-established gradation (0–5).¹⁰ All treatment(s) were taken into account, even for treatments of short duration.

2.4. Statistical analyses

Continuous data are expressed as medians with interquartile range (IQR), and differences between the groups were tested for significance with Wilcoxon rank sum tests for paired or unpaired comparisons as appropriate. Discrete data are given as percentages, and comparisons were made with Pearson chi-squared tests. Periods before and after the diagnosis of cancer were compared both at the individual level and after pooling patient-years within the period considered. The year of diagnosis of cancer was included in the period prior to cancer when the diagnosis of cancer was made before June 30 of the calendar year, and in the subsequent period in the other cases. Inter-individual comparisons considered the period preceding cancer diagnosis and the period subsequent to cancer diagnosis. Only patients having durations of follow-up lasting more than one year both before and after diagnosis of cancer were included in this comparison. Percentages of patient-years were calculated by pooling all patient-years within each consecutive period. Subset analyses were performed in patients who received cytotoxic chemotherapy.

Comparisons with the control group first considered the total of patient-years of the period subsequent to the date of cancer diagnosis in the two groups. In addition, a paired comparison was performed considering the variations of mean individual percentages of years with active disease,

the use of immunosuppressants including biologics, and intestinal surgery, respectively, before and after the date of cancer diagnosis, in matched patients of both groups having durations of follow-up lasting more than one year both before and after diagnosis of cancer. Calculations were performed using GBSTAT v10 (Silver Spring, MD, USA). *P* values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Patients' characteristics

Medical charts of 115 IBD patients with current or recent (diagnosed after 1990) cancer were reviewed. Thirty-five patients were excluded as follows: 18 had a follow-up duration below six months after cancer diagnosis, two patients with a non-melanoma skin cancer were more than 90 years old, 11 patients had their last visit before 1995, and four patients had a cancer in remission for more than 10 years at the date of diagnosis of IBD. A total of 80 patients (33 males and 47 females) with a diagnosis of cancer, were included. Fifty-one had CD and 29 had UC. CD disease location according to the Montreal classification was ileal (L1) in 16 patients, colonic (L2) in 15 and ileocolonic (L3) in 20. Median age was 38 yrs (IQR 29–51) at diagnosis of IBD and 48 yrs (IQR 40–59) at cancer diagnosis. Cancer was diagnosed in 15 cases before IBD diagnosis (median interval 48 months [IQR 15–78]), and in 65 cases after IBD diagnosis (median interval 136 months [IQR 77–202]). The diagnosis of cancer was confirmed histologically in all cases. Predominant cancer sites were breast (27%) and skin (14%). Repartitions of different cancer sites are given in Table 1.

3.2. Outcomes

Eight patients eventually died. Causes of death were cancer-related in 6 patients, cardiovascular disease in one patient and septic shock in one patient following surgery for severe

acute colitis. Twenty-two patients were lost to follow-up while free of cancer, and 8 were lost to follow-up while not cancer-free. Among the 42 patients still alive at last evaluation in 2010, 29 were free of cancer and 13 had cancer in treatment.

3.3. Individual therapeutic changes after cancer diagnoses

The diagnosis of cancer led to IBD treatment modifications in a large proportion of patients. In the 15 patients who developed cancer before IBD (7 CD, 8 UC), only four (2 CD, 2 UC) received immunosuppressants (AZA, *n* = 2; methotrexate, *n* = 2) within the first three years of the disease. In patients who were diagnosed with cancer while having IBD, there was also some restraint shown in starting or continuing immunosuppressants during the three following years: only one patient out of 41 who was not on immunosuppressants at cancer diagnosis was subsequently placed on immunomodulators (methotrexate). Among the 21 patients on AZA, AZA was stopped and not replaced in five patients (2 CD, 3 UC), switched to methotrexate in three patients (2 CD, 1 UC), switched to anti-TNF monotherapy in three patients (3 CD, including one patient with multiple basal cell carcinomas), and maintained in ten patients (7 CD, 3 UC). One of these latter patients had a metastatic breast cancer while others had had curative surgery (four cases of non melanoma skin cancer, one of renal carcinoma, one of thyroid cancer) or were controlled by treatment (two cases of hematopoietic malignancy, one of prostate cancer). Anti-TNF was stopped in two out of the three patients under this regimen at cancer diagnosis. Five patients were operated on during the three years following diagnosis of cancer, in three cases after failure of immunosuppressants: two had intestinal resection for CD and three had a colectomy for UC. In total, when comparing treatment during the three years before vs. the three years after diagnosis of cancer, the use of immunosuppressants decreased from 33 to 25% of patient-years in CD (NS), and from 27 to 16% in UC (NS), without significant difference between CD and UC.

3.4. Inter-individual comparisons of IBD activity before and after cancer diagnosis

Fifty-five patients (38 CD, 17 UC) from the cancer group had an IBD follow-up of more than one year both before and after cancer diagnosis. The median value for percentages of years with active disease in individuals was 27% (IQR 0–50) before diagnosis of cancer and 19% (IQR 0–53) afterwards. This difference was not significant (NS). In this subset of patients, the number of patients placed or maintained on immunomodulators or anti-TNF did not change significantly, although nine patients (16%) were switched to or placed on methotrexate afterwards (Table 2). Likewise, percentages of years on immunosuppressants (including biologics) and with abdominal surgery, respectively, were not significantly different between the two consecutive periods. Pooling all patient-years confirmed the absence of significant differences between the two periods regarding disease activity (from 32% of patient-years to 28%) and the use of immunosuppressants, including anti-TNF (from 26% of patient-years to 28%). The use of immunomodulators evolved from 25% of

Table 1 Cancer sites of IBD patients with malignancies.

Patients	Total (<i>n</i> = 80)	Chemotherapy (<i>n</i> = 29)
Breast	22	15
Kidney and bladder	10	1
Non melanoma skin cancer	9	0
Prostate	8	0
Uterus	5	2
Testis or ovary	4	2
Thyroid	4	0
Hematopoietic system	4	3
Head and neck	3 ^a	1
Oesophagus and stomach	2 ^a	1
Lung	3	3
Melanoma	2	0
Neuroendocrine tumour	2	0
Pancreas	1	1
Penis	1	0
Hepatocellular carcinoma	1	0

^a One patient had both laryngeal and oesophagus carcinoma.

Table 2 Treatment in 55 IBD patients before and after diagnosis of extra-intestinal cancer.

	Before cancer diagnosis	After cancer diagnosis	<i>p</i>
Median (IQR) duration of follow-up (years)	6 (4–10)	5 (3–11)	NS
Free of immunosuppressants (%)	35 (64)	31 (56)	NS
Azathioprine (%)	19 (34)	16 (29)	NS
Methotrexate (%)	0 (0)	9 (16)	0.001
Anti-TNF (%)	3 (5)	7 (13)	NS
Operated on (intestinal resection) (%)	8 (14)	15 (27)	NS

NS = not significant.

patient-years to 22% (NS). As expected, while considering only calendar years after 1999 (when anti-TNF became available in France), there was an increase in anti-TNF use (from 4 to 11% of patient-years). Finally, the surgical rate tended to increase, from 2.6 to 4.5% of patient-years, but this variation was not significant.

3.5. Effects of cytotoxic chemotherapy

Twenty-nine patients (21 CD, 8 UC) with cancer received chemotherapy. In the short term, chemotherapy was not associated with increased IBD activity. Eleven patients (38%) developed a flare during the year of chemotherapy, while disease was active in 49% of cancer patients who did not receive chemotherapy during the year following diagnosis of cancer. When analysing disease activity over the subsequent two years (22 patients treated with chemotherapy had a follow-up of more than 3 years afterwards), the effects of chemotherapy were again not significant: there were 15 patient-years with active disease (33%) in those having received chemotherapy, vs. 25 patient-years with active disease (32%) in the group without chemotherapy.

3.6. Comparisons between cancer and control groups

Characteristics of IBD patients constituting cancer and control groups, respectively, are given in Table 3. There

were 629 patient-years of follow-up after cancer diagnosis in the cancer group and 2121 patient-years after the date of diagnosis of the index case in controls. A total of 192 patient-years of active disease (31%) and 52 patient-years with hospitalisation (8%) were observed in the cancer group, compared to 644 patient-years of active disease (30%) and 135 patient-years with hospitalisation (6%), respectively, in controls. These differences were not significant.

The proportion of patient-years on steroids without immunomodulators or anti-TNF was not significantly different between the two groups (10% in patients with cancer vs. 9% in controls). The use of anti-TNF was also not different between the two groups: 6% of patient-years in the cancer group vs. 4% in controls. However, immunomodulators were used less frequently in the cancer group (118 patient-years, 19%) compared to controls (517 patient-years, 25%; $p < 0.001$). Conversely, the number of patient-years with intestinal surgery was increased in the cancer group (4% of patient-years) compared with controls (2.5% of patient-years; $p < 0.05$). This trend towards decreasing use of immunomodulators and increasing use of surgery in patients with cancer vs. controls was observed in both CD and UC.

To compare the variations in disease activity and therapeutic requirements before and after the date of cancer diagnosis (or index date), 50 patients with cancer and 150 matched controls, respectively, could be analysed. No significant differences were observed between the two groups (Fig. 1).

Table 3 Characteristics of IBD patients with and without cancer (control group).

	Cancer (<i>n</i> = 80)	Controls (<i>n</i> = 240)
Males (%)	33 (41)	99 (41)
Median (IQR) calendar year of birth	1949 (1940–1959)	1949 (1941–1959)
Median (IQR) calendar year of IBD diagnosis	1991 (1985–1997)	1991 (1984–1997)
IBD phenotype (CD/UC)	51/29	153/87
Median (IQR) age at IBD diagnosis (years)	38 (29–51)	37 (28–49)
Median (IQR) duration of IBD (years)	16 (11–23)	18 (11–26)
Smoking status (%)		
Current	17 (21)	50 (21)
Previous	32 (40)	73 (30)
Never	31 (39)	117 (49)
Localisation of disease (%)		
Ileal (L1)	16 (20)	45 (19)
Colonic (L2 or UC)	44 (55)	127 (53)
Ileocolonic (L3)	20 (25)	68 (28)

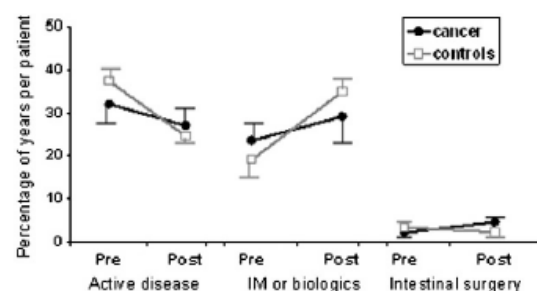


Figure 1 Comparison of percentages of years per patient with active disease, use of immunomodulators (IM) or biologics, and intestinal surgery, before (pre) and after (post) diagnosis of cancer (or index date in controls), between 50 IBD patients with cancer and their 150 matched controls. Values are means \pm standard error. The variations of the percentages from pre to post did not differ significantly between the two groups.

4. Discussion

The present study, using a clinical prospective database with prolonged follow-up, showed that extra-intestinal cancer diagnosis was not associated with significant modifications of IBD activity, either when comparing in individuals the periods prior to and subsequent to the diagnosis of cancer or when comparing IBD evolution with IBD patients without cancer. However, diagnoses of extra-intestinal cancer led to some changes in therapeutic strategy, with a lesser use of thiopurines and an increased use of intestinal surgery.

This study has several limitations. First, the study design was retrospective, although data were collected prospectively after 1995 from the MICISTA registry. When evaluating disease activity over one year it may be difficult to classify whether intestinal symptoms are related to IBD or to cancer and its treatment if not using a predesigned scale. To avoid this difficulty, we excluded patients with intestinal cancer and a year was considered active only in the case of a flare leading to a change in the treatment of IBD. Second, the study was mono-centric, included a relatively small number of patients, and there was a high rate of loss to follow-up. Third, comparisons of changes in activity and treatment after vs. before diagnosis of cancer are difficult to interpret if one considers that IBD activity tends to decrease with time, that immunosuppressants are used more and more, and that anti-TNF became available in France only in 1999. To overcome these concerns, we evaluated evolutionary and therapeutic changes in comparison with a control group with IBD diagnoses in the same period as the cancer group. Finally, our study did not include a comparative group of cancer patients without IBD for assessing the evolution of cancer. The effect of IBD and its treatment on cancer evolution was beyond the scope of our study.

The diagnosis of cancer had a marked impact on the management of IBD in our cohort. Thiopurines were often stopped or switched to methotrexate, while anti-TNF were used occasionally and avoided in cases of severe malignancy. Our study was not designed to assess the effects of different IBD therapies on the evolution of cancer, and no conclusions can be drawn regarding the validity of these therapeutic options. The impact of immunomodulators on the occurrence

of cancer has been assessed in IBD as in other disease states such as rheumatoid arthritis or transplantation.^{12,13} Imputability of thiopurines in the development of non-melanoma skin cancers and lymphomas is well established.^{14,15} The effect of these drugs once the cancer has developed is less known. In colorectal cancer, immunosuppressants (azathioprine, ciclosporine, methotrexate, anti-TNF) have a negative effect on overall survival and disease-free survival.¹⁶ In patients with ocular inflammation receiving immunosuppressants, thiopurines were associated with increased cancer-related mortality.¹⁷ It is not clear that methotrexate conveys similar disadvantages. Indeed, in rheumatoid arthritis, low-dose methotrexate is not associated with an increased cancer risk¹⁸ and high doses of methotrexate are currently used throughout treatment of several cancers including breast cancer, cancer of the urinary tract or squamous cell carcinoma.^{19,20} Finally, the effects of anti-TNF on cancer risk and cancer evolution are debated. In IBD, anti-TNF is associated with an increased risk of melanoma.²¹ A recent metanalysis in rheumatoid arthritis concluded that the increased risk of malignancy with anti-TNF was limited to skin cancers.²² In the case of previous malignancies, the risk of recurrence was not increased by maintenance of anti-TNF treatment. Moreover, several studies examined the effect of anti-TNF for improving cachexia and increasing chemotherapy tolerance in patients with cancers such as non-small cell lung cancer, renal cell carcinoma, and advanced cancer or pancreatic cancer.^{23–27} Some of these phase II studies have reported a positive effect,^{23,26} although these effects have not been confirmed in phase III.^{24,27} In patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF, the occurrence of cancer during treatment was not associated with a worse prognosis.²⁸ Finally, anti-TNF may have a protective effect by reducing aggressive metastatic breast cancers at a cellular level.²⁹ Thus, more studies are needed to better assess the effects of anti-TNF on the evolution of cancer in patients with chronic inflammatory diseases.

The evolution of IBD in patients with concomitant cancer has received little attention in the literature. Axelrad et al. showed that cancer treatment might reactivate IBD in patients in remission. However, the effect of cancer treatment was moderate and dependent upon the type of treatment.⁸ Indeed, only ten percent of patients who received cytotoxic chemotherapy developed a flare at 5 years, compared with 36% of those who received hormone therapy or the combination of cytotoxic chemotherapy and adjuvant hormone therapy. In that series there was no important modification of the treatment of IBD concomitant to the diagnosis of cancer: anti-TNF was maintained in the three patients on this regimen and the proportion of patients on immunomodulators decreased slightly, from 22 to 14%.⁸ Our study did not examine the effects of hormonotherapy. Cytotoxic chemotherapy was not followed by a significant worsening of disease activity. Modifications of IBD treatment, particularly the decreasing use of thiopurines, were more marked than in the study of Axelrad et al. Despite those modifications, cancer diagnosis did not influence IBD activity, as patients with cancer experience a long-term course of IBD similar to that of IBD patients without cancer.

In conclusion, this study suggests that IBD patients with associated extra-intestinal cancer experience a long-term course of IBD no different from IBD patients without cancer.

Gastroenterologists who consider IBD therapeutic options in patients diagnosed with cancer should take into account these results. However, the specific effects of thiopurines, methotrexate, and anti-TNF on the evolution of various extra-intestinal cancers should be studied further to better define the therapeutic strategy for each individual, according to type and site of cancer and prior evolution of IBD.

Conflict of interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

References

- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1785–94.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095–128.
- Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Cancer risks in Crohn disease patients. *Ann Oncol* 2009;20:574–80.
- Shu X, Ji J, Sundquist J, Sundquist K, Hemminki K. Survival in cancer patients hospitalized for inflammatory bowel disease in Sweden. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:816–22.
- Sogaard KK, Cronin-Fenton DP, Pedersen L, Sorensen HT, Lash TL. Survival in Danish patients with breast cancer and inflammatory bowel disease: a nationwide cohort study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:519–25.
- Beaugerie L. Inflammatory bowel disease therapies and cancer risk: where are we and where are we going? *Gut* 2012;61:476–83.
- Dasari BV, McBrearty A, Gardiner K. Immunosuppression in patients with Crohn's disease and neoplasia: an ongoing clinical dilemma. *Dis Colon Rectum* 2012;55:1008–11.
- Axelrad JE, Fowler SA, Friedman S, Ananthakrishnan AN, Yajnik V. Effects of cancer treatment on inflammatory bowel disease remission and reactivation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:1021–7 [e1].
- Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007;121:2373–80.
- Cosnes J, Bourrier A, Nion-Larmurier I, Sokol H, Beaugerie L, Seksik P. Factors affecting outcomes in Crohn's disease over 15 years. *Gut* 2012;61:1140–5.
- Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tiret E, Gendre JP. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005;54:237–41.
- Beauparlant P, Papp K, Haraoui B. The incidence of cancer associated with the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1999;29:148–58.
- Ulrich C, Stockfleth E. Azathioprine, UV light, and skin cancer in organ transplant patients—do we have an answer? *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1027–9.
- Peyrin-Biroulet L, Khosrotehrani K, Carrat F, Bouvier AM, Chevaux JB, Simon T. Increased risk for nonmelanoma skin cancers in patients who receive thiopurines for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;141:1621–8 [e1–5].
- Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lémann M, Cosnes J. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet* 2009;374:1617–25.
- Khoury W, Lavery IC, Kiran RP. Effects of chronic immunosuppression on long-term oncologic outcomes for colorectal cancer patients undergoing surgery. *Ann Surg* 2011;253:323–7.
- Kempen JH, Daniel E, Dunn JP, Foster CS, Gangaputra S, Hanish A. Overall and cancer related mortality among patients with ocular inflammation treated with immunosuppressive drugs: retrospective cohort study. *BMJ* 2009;339:b2480.
- Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1100–4.
- Tortochaux J, Tao Y, Tournay E, Lapeyre M, Lesaunier F, Bardet E. Randomized phase III trial (GORTEC 98-03) comparing re-irradiation plus chemotherapy versus methotrexate in patients with recurrent or a second primary head and neck squamous cell carcinoma, treated with a palliative intent. *Radiother Oncol* 2011;100:70–5.
- Wosnitzer MS, Hruby GW, Murphy AM, Barlow LJ, Cordon-Cardo C, Mansukhani M. A comparison of the outcomes of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for clinical T2–T4aN0–N2M0 bladder cancer. *Cancer* 2012;118:358–64.
- Long MD, Martin CF, Pipkin CA, Herfarth HH, Sandler RS, Kappelman MD. Risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2012;143:390–9 [e1].
- Mariette X, Matucci-Cerinic M, Pavelka K, Taylor P, van Vollenhoven R, Heatley R. Malignancies associated with tumour necrosis factor inhibitors in registries and prospective observational studies: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1895–904.
- Tookman AJ, Jones CL, DeWitte M, Lodge PJ. Fatigue in patients with advanced cancer: a pilot study of an intervention with infliximab. *Support Care Cancer* 2008;16:1131–40.
- Jatoi A, Ritter HL, Dueck A, Nguyen PL, Nikcevic DA, Luyun RF. A placebo-controlled, double-blind trial of infliximab for cancer-associated weight loss in elderly and/or poor performance non-small cell lung cancer patients (N01C9). *Lung Cancer* 2010;68:234–9.
- Wiedenmann B, Malfertheiner P, Friess H, Ritch P, Arseneau J, Mantovani G. A multicenter, phase II study of infliximab plus gemcitabine in pancreatic cancer cachexia. *J Support Oncol* 2008;6:18–25.
- Harrison ML, Obermueller E, Maisey NR, Hoare S, Edmonds K, Li NF. Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J Clin Oncol* 2007;25:4542–9.
- Larkin JM, Ferguson TR, Pickering LM, Edmonds K, James MG, Thomas K. A phase I/II trial of sorafenib and infliximab in advanced renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2010;103:1149–53.
- Raaschou P, Simard JF, Neovius M, Askling J. Does cancer that occurs during or after anti-tumor necrosis factor therapy have a worse prognosis? A national assessment of overall and site-specific cancer survival in rheumatoid arthritis patients treated with biologic agents. *Arthritis Rheum* 2011;63:1812–22.
- Hamaguchi T, Wakabayashi H, Matsumine A, Sudo A, Uchida A. TNF inhibitor suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;407:525–30.

Crosstalk Between the Hepatologist and the Cardiologist: A Future Place for the Lithocholic Acid as a Coronary Atheroma Risk Factor?

To the Editor:

Although low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, synthesized by liver, is one of the main risk factors of coronary atheroma in humans, clinical practice has taught us that meetings between our 2 specialties are not about this subject, except maybe when discussing the opportunity of a liver transplantation in patients with severe coronary disease. Recent works demonstrating a strong protective effect of the bile acids receptor FXR and TGR5 in a mice models of atheroma^{1,2} could change this old rule in the not so distant future, but so far no evidences exists in humans. The level of activation of these receptors depends on the type of bile acids that activate them.³ We designed a pilot prospective and observational study conducted between June 2010 and September 2010 to search for variations in the bile acid pool composition between 2 populations: patients with or without coronary atheroma. We determined the serum concentrations of cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic, and lithocholic acids in a fasting blood sample in all consecutive patients undergoing coronary angiograms in the cathlab unit of Cochin Hospital. Applying very restrictive exclusions criteria to avoid artificial variations of the bile acid pool (post-cardiac arrest; nonfasting states; hepatic disease; treatment with antimicrobials, corticosteroids, statins, or fibrates) of 393 screened patients, 44 met the criteria and were divided between 27 with (group A) and 17 without (group B) angiographically visible coronary atheromas.

Except for more males in group A, the groups were comparable. The serum lithocholic acid (LCA) concentration was significantly lower in group A (median 0.03 $\mu\text{mol/L}$; interquartile range 0.02–0.05) than in group B (0.08 $\mu\text{mol/L}$; interquartile range

0.05–0.11; $P = 0.015$) (Fig. 1). In the multivariate analysis, LCA was the only predictor of coronary atheroma independently of patient gender (odds ratio 2.41 per 0.05 decrease; 95% confidence interval 1.11–5.25; $P = 0.027$).

Although the populations were small, we believe this observation connecting LCA and coronary atheroma is a field worth investigating further, as LCA is the most powerful activator of TGR5.³ A study targeting the proinflammatory mechanism acting in atheroma plaque evidenced that the activation of the TGR5 receptor significantly limits the formation of plaques in LDL-/- mice by decreasing the inflammation inside the plaque and the proinflammatory cytokines secretion by macrophages. This raises the hypothesis that lowering the most prominent activator of TGR5 is likely to lower the protection against plaque development in humans. Further studies are needed to confirm this observation, to better understand the origin and the extent to which a decrease in LCA is implicated in the development of coronary atheromatous plaques, and to maybe put us hepatologists and cardiologists more often around the same table.

HENRI DUBOC, M.D.^{2,3}

HÉLÈNE AELION, M.D.¹

DOMINIQUE RAINEAU, Ph.D.³

SYLVIE RAJCA, M.D.³

HARRY SOKOL, M.D., Ph.D.³

LYDIE HUMBERT³

DOMINIQUE FARABOS³

BENOIT COFFIN, M.D., Ph.D.²

SIMON WEBER, M.D.¹

RAPHAËL PORCHER, Ph.D.⁴

OLIVIER VARENNE, M.D., Ph.D.¹

DENIS DUBOC, M.D.¹

¹University Paris Descartes, AP-HP, Cochin Hospital, Department of Cardiology, Paris, France

²University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, AP-HP, Louis Mourier Hospital, Department of Gastroenterology and Hepatology, Paris, France

³University Pierre and Marie Curie, ERL INSERM U 1057/UMR 7203, AP-HP, Saint-Antoine Hospital, Paris, France

⁴University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR-S 717, APHP, Saint Louis Hospital, Biostatistic and Medical Informatics Department, Paris, France

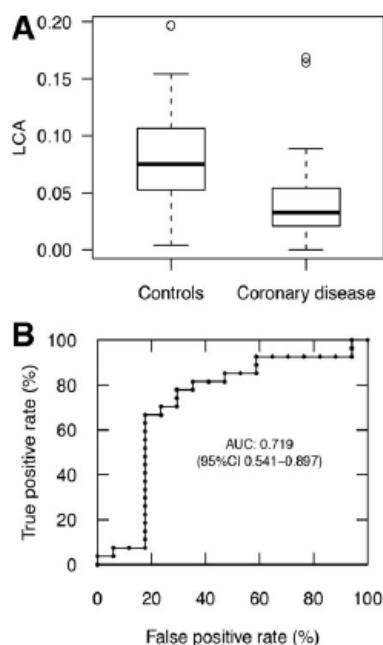


Fig. 1. (A) Box and whisker plots showing the median, and 25th and 75th percentiles of the distribution (box) and whiskers extending to the most extreme data point, which is no more than 1.5 times the interquartile range from the box. (B) Receiver operating characteristics curve. The area under the curve (AUC) is presented with its 95% confidence interval (95% CI). LCA, lithocholic acid.

References

- Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296:H272–H281.
- Pols TWH, Nomura M, Harach T, et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab* 2011;14:747–757.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003;278:9435–9440.

Henri Duboc, M.D., and Hélène Aelion, M.D. contributed equally.

Language was improved by CardioScript international, Salt Lake city, UT, USA.

Copyright © 2012 by the American Association for the Study of Liver Diseases. View this article online at www.wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.25839

Potential conflict of interest: Dr. Varenne has received funding from Abbott laboratories.

Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

H. DUBOC,*,†,‡, D. RAINTEAU,‡, S. RAJCA,‡, L. HUMBERT,‡, D. FARABOS,‡, M. MAUBERT,‡, V. GRONDIN,‡, P. JOUET,*,†, D. BOUHASSIRA,†, P. SEKSIK,‡, H. SOKOL,‡, B. COFFIN*,† & J. M. SABATÉ*,†

*Hepato Gastro Enterology Department, Louis Mourier Hospital, University Paris VII, AP-HP, Colombes, France

†Pain Pathophysiology and Pharmacology Unit, INSERM U 987, Ambroise Paré Hospital, Boulogne, France

‡ERL U1057/UMR 7203 Inserm, University Paris VI, Paris, France

Abstract

Background Irritable bowel syndrome (IBS) is a multifactorial disease for which a dysbiosis of the gut microbiota has been described. Bile acids (BA) could play a role as they are endogenous laxatives and are metabolized by gut microbiota. We compared fecal BA profiles and microbiota in healthy subjects (HS) and patients with diarrhea-predominant IBS (IBS-D), and we searched for an association with symptoms.

Methods Clinical features and stool samples were collected in IBS-D patients and HS. Fecal BA profiles were generated using HPLC coupled to tandem mass spectrometry. The fecal microbiota composition was assessed by q-PCR targeting dominant bacterial groups and species implicated in BA transformation.

Key Results Fourteen IBS-D patients and 18 HS were included. The two groups were comparable in terms of age and sex. The percentage of fecal primary BA was significantly higher in IBS-D patients than in HS, and it was significantly correlated with stool consistency and frequency. Fecal counts of all bacteria, *Lactobacillus*, *Coccoides*, *Leptum* and *Faecalibacterium prausnitzii* were similar. There was a significant increase of *Escherichia coli* and a significant decrease of *Leptum* and *bifidobacterium* in IBS-D patients.

Conclusions & Inferences We report an increase of primary BA in the feces of IBS-D patients compared to HS, correlated with stool consistency and frequency. A dysbiosis of different bacterial groups was detected, some of them involved in BA transformation. As the gut microbiota is the exclusive pathway to transform primary into secondary BA, this suggests a functional consequence of dysbiosis, leading to lower BA transformation.

Keywords α -dehydroxylation, bile acids, diarrhea, dysbiosis, IBS, microbiota.

Abbreviations: BA, bile acid; BAM, bile acid malabsorption; CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DA, deoxycholic acid; HPLC-MS/MS, high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; IBD, inflammatory bowel disease; IBS-D, diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; LCA, lithocholic acid; qPCR, quantitative real-time PCR.

ALREADY KNOWN

- Bile acids are endogenous laxatives.
- They have been implicated in pathophysiology of diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D).
- A dysbiosis is described in irritable bowel syndrome.

NEW FINDINGS

- Increase in fecal primary bile acids in IBS-D patients compared to HS. This was correlated with stool frequency and consistency.
- Dysbiosis concerning bacterial species implicated in bile acids metabolism.

Address for Correspondence

H. Duboc, Hepato Gastro Enterology Department, Louis Mourier Hospital, University Paris VII, AP-HP, Colombes, France.

Tel: +33 1 47 60 63 93; fax: +33 1 47 60 60 72;

e-mail: henri.duboc@gmail.com

The results have been presented for an oral communication at the annual meeting of the American Neurogastroenterology and Motility Society, Boston, MA, August 2010.

Received: 19 September 2011

Accepted for publication: 11 January 2012

IMPACT FOR CLINICAL PRACTICE

- Targeting bile acids and dysbiosis in the treatment of IBS-D.

INTRODUCTION

Irritable bowel syndrome (IBS) is the most common functional disorder.^{1,2} Its pathophysiology is multifactorial, including non-specific alterations in gut motility, visceral hypersensitivity, mucosal micro-inflammation, increases in intestinal permeability, psychosocial factors, and brain-gut dysfunctions. Dysbiosis, i.e., a qualitative or quantitative imbalance of intestinal microbiota, has recently emerged as an important pathophysiological hypothesis.³ Temporal microbiotic instability,⁴ phylotypic alterations,⁵ and variations in the dominant bacterial groups⁶ have been recently demonstrated in IBS patients. However, most of the previous studies are descriptive, and the links between dysbiosis and the clinical symptoms of IBS remain unclear.

In addition to performing the regulatory functions of intestinal homeostasis through the modulation of intestinal permeability and epithelial cell function and growth,⁷ the microbiota also has metabolic functions, including the metabolism of bile acids (BA) through two reactions: transformation and deconjugation.

Bile acids are normal components of fecal material, and their roles have been poorly evaluated in IBS pathophysiology. Bile acids can be considered as endogenous laxatives that influence transit time and stool consistency. The mechanisms of action include stimulation of colonic motility^{8–13} both in animals and in healthy subjects (HS). They also increase mucosal permeability,^{14–16} decrease net fluid and electrolyte absorption, and promote net secretion across colonic epithelial cells.^{17,18} A massive efflux in the intestinal lumen, as occurs in bile acid malabsorption (BAM), causes diarrhea. Bile acid malabsorption may be diagnosed in 30–50% of patients with chronic idiopathic diarrhea.^{19–22} A recent and original therapeutic approach for patients with diarrhea-predominant IBS (IBS-D) has been proposed based on the BA sequestrant, colestevlam,¹² which enhances the ease of passage of stool. In the same work, the oral administration of the primary BA chenodeoxycholic acid (CDCA) was found to enhance transit time and decrease stool consistency in HS.¹² Two recent randomized and double blind trials in humans have also proved the safety, tolerability, and potential efficiency of an inhibitor of ileal BA absorption in treatment of chronic idiopathic constipation.^{23,24} Preliminary studies in humans and animals

based on the colonic perfusion of BA showed that the laxative effect depends on the BA species and concentration.²⁵ The BA pool in humans is composed of different BA species determined by the BA enterohepatic cycle. Briefly, the liver synthesizes two primary BAs from cholesterol, cholic acid (CA) and CDCA, and conjugates them into an amino acid. Bile acids are actively reabsorbed in terminal ileum and 5% are excreted in feces. There is a dramatic difference in the composition of BA species between feces and bile.²⁶ This is due to BA biotransformation by the gut microbiota. The fecal BA pool composition is determined by two bacterial metabolic reactions²⁶: firstly, the deconjugation of the amino acid and second, the transformation of primary BA into secondary BA. The primary cholic acid is transformed into the secondary deoxycholic acid (DCA), and the primary chenodeoxycholic acid is transformed into the secondary lithocholic acid (LCA). Thus, the fecal BA pool depends on the gut microbiota metabolic activity and is mainly composed of secondary DCA and LCA. Primary BAs are minor species in feces, and amino-conjugated BAs, ursodeoxycholic acid (UDCA), and sulphated BAs are present in trace amounts.

We hypothesized that the fecal BA composition might change under the influence of dysbiosis in IBS-D patients, which could be involved in some of the clinical symptoms of IBS-D. The aims of the present study were to assess the fecal BA species profile and microbiota composition, especially of those implicated in BA transformation, in IBS-D patients and HS, and to identify any correlation with clinical symptoms.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

Patients were recruited in a tertiary care center. The study protocol was approved by the local ethics committee and performed according to the declaration of Helsinki. For all patients and HS, an informed written consent was obtained. Patients and HS age ranged from 18 to 65 years old. The diagnosis of IBS-D was defined by the Rome 3 criteria.²⁷ Patients with lactose intolerance and organic diseases, including inflammatory bowel diseases, liver disease, pregnancy, and significant systemic diseases, were excluded. Patients were free of any previous treatment, including probiotics, antibiotics, steroids, immunosuppressors, transit modulators, and antipsychotics, during the 3 months preceding inclusion. All subjects provided informed consent. For the patients, basal clinical data were measured and reported by the patients for 7 days before sampling in a self-evaluation book. Stool consistency was determined by the Bristol stool scale. Stool frequency per day was measured, and a visual analogical scale graduated from 0 to 10 was used to report the daily abdominal pain score and the daily bloating score. After inclusion, the first stool in the morning was collected at

home by each subject, and it was kept in an Anaerocult A (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) jar at 4 °C. The patients had to bring the sample to the hospital within 24 h following collection. The samples were then stored at -80 °C until analysis.

Measurement of fecal bile acids

Chemicals and reagents All chemicals and solvents were of the highest purity available. Cholic acid, DCA, CDCA, UDCA, LCA, hyocholic acid (HCA), hyodeoxycholic (HDCA), muricholic acid (MCA) and the corresponding glyco- and tauro-derivatives were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The 3-sulphate derivatives were a generous gift from Dr J. Goto (Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, Niigata, Japan), and 23-nor-5 α -cholanoic acid-3 α ,12 β -diol was purchased from Steraloids Inc., (Newport, RI, USA). Acetic acid, ammonium carbonate and ammonium acetate were also purchased from Sigma-Aldrich.

Standard solutions Standard stock solutions were prepared in methanol at a concentration of 1 mg mL⁻¹ and stored in a sealed container at -20 °C. The stock solutions were pooled and diluted to obtain mixed calibration BA solutions with concentrations ranging from 31.3 μ g mL⁻¹ to 31.3 ng mL⁻¹. Standard solutions were available for the 28 bile acids reported in the supplementary files (Table S1).

Sample preparation Two microliters (μ L) of the internal standard solution (23-nor-5 β -cholanoic acid-3 α ,12 β -diol at 1 mg mL⁻¹) was added to 0.1 g of lyophilized fecal samples using a Thermo Savant Speedvac (Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France) (SPD 111V) coupled to a cooled vapour trap (RTV400; Thermo Fisher Scientific). Bile acid was released from the binding protein via the addition of 0.4 mol L⁻¹ ammonium carbonate at a ratio of 4 mL/1 mL of sample, and the samples were incubated for 30 min at 60 °C. For stool samples, 4 mL of water was added, and the solution was homogenized by two 30 s runs in an Ultra-Turrax disperser (IML AB, Lille, France). The pre-analysis clean-up procedure was achieved by centrifugation (at 20 000 g for 20 min) followed by solid-phase extraction using reversed-phase silica cartridges. These Chromabond C18 cartridges (100 mg, Macherey-Nagel, Düren, Germany) were preconditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of water in succession. Samples were then loaded onto the cartridge, and the subsequent elution steps were conducted using a vacuum manifold. The cartridge was rinsed with water (20 mL), followed by hexane (10 mL) and then, again, by water (20 mL). The BAs were finally eluted and collected in a methanol eluate. The methanol was evaporated off under nitrogen at 50 °C, and the residue was re-suspended in 150 μ L of methanol, of which 5 μ L was injected into the high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) system.

HPLC-MS/MS analysis For the HPLC-MS/MS analysis, separation of BA as a function of polarity was performed using an analytical column (Pinnacle II C18, Restek, Lisses, France; 250 \times 3.2 mm (L \times ID), 5 μ m silica particle (Restek) fitted on an HPLC binary pump (Agilent 1100; Agilent Technologies, Massy, France). The mobile phase comprised a mixture of 'buffer A' (ammonium acetate 15 mmol L⁻¹, pH 5.3) and 'solvent B' (methanol) in the proportions indicated. High-performance liquid chromatography was coupled in series with the turbo ion-spray (ESI) source of the tandem mass spectrometer (QTRAP 2000; Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, ON, Canada). Electrospray ionization was performed in negative mode with nitrogen as the nebulizer gas. The temperature of the evaporation gas was set at 400 °C. The

ion-spray, declustering and entrance potentials were set at -4500, -60, and -10 V, respectively. Collision-induced dissociation was achieved in a Q2 collision cell under various voltage potentials, depending on conjugation, and MS/MS detection was conducted with unit/unit resolution in the multiple reaction monitoring (MRM) modes. The dwell time of the ion trap was set at 70 ms for each transition. Data were acquired using Analyst 1.4.2 software (AB SCIEX SARL, Les Ulis, France).

Multiple reaction monitoring at low collision energy focuses on transition reactions from precursor ions to product ions after cleavage of taurine, glycine, and sulphate fragments. Bile acid quantitation was expressed as the proportion (%) of each specific BA (\pm SEM) of the total BA after calibration of the method with weighed mixtures and normalization relative to the internal standard (nordeoxycholic acid).

Gut microbiota real-time quantitative PCR

Fecal DNA was extracted from 200 mg of feces as described elsewhere,²⁸ and real-time qPCR (quantitative polymerase chain reaction) was performed as previously described.²⁹ In brief, a qPCR thermocycler (Stratagene Mx3000P; La Jolla, CA, USA) was used. Amplification and detection were carried out using 96-well plates and SYBR Green PCR Master Mix (2X) to quantify the total bacteria and the dominant bacterial groups in the microbiota. Each reaction was performed in duplicate. Amplifications were performed at 95 °C for 10 min to denature the DNA and activate the AmpliTaq Gold Polymerase followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s and 60 °C for 1 min. A dissociation step was added, and the dissociation curves were analyzed to confirm the identity and fidelity of amplification of the SYBR Green products. The real-time species-specific 16S rRNA-targeted primers used in the present study were purchased from MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany). The primer sequences used were designed for studies of dominant bacterial groups and specific species.³⁰ The total count of bacteria using all bacteria primers was first analyzed. The dominant groups studied were *bacteroides/prevotella*, *coccoides*, *leptum*, *bifidobacterium*. The subdominant group studied was *lactobacillus/leuconostoc/pediococcus*. Specifically studied species were *Faecalibacterium prausnitzii* and *E. coli*. The primer sequences are described in Table S2. *Coccoides*, *bacteroides*, *leptum* and *E. coli* were implicated in BA transformation.

Statistical analysis

Statistical analyses for significant differences were performed using the Student's *t*-test or the Wilcoxon's non-parametric test when appropriate. Bile acid results are presented as the mean % of a group or a specific BA \pm SEM. Statistical analysis of BA in feces was based on the total BA, primary BA, secondary BA, amino-conjugated BA, sulfo-conjugated BA, and UDCA. For example, the total primary BA is the sum of CA and CDCA and their respective glyco-, tauro-, and sulphoderivatives, and total CA is reported as the sum of CA and its derivatives. To note, due to a small amount in feces of minor BA species (MCA, HCA, HDCA, or UDCA) that are the products of epimerization reaction of some bacteria and are considered by some authors as 'tertiary BA', the sum of primary and secondary bile acids is not 100%.

For bacterial counts, calculations were performed from the Log₁₀ of the number of bacteria found in each individual. We used the Spearman non-parametric correlation test to search for correlations between BA composition and clinical features. For correlation analysis with the clinical features, assuming that the laxative mechanism of action of BA is the same in HS as in IBS, we decided to pool IBS-D and HS to increase the power of the analysis.

RESULTS

Population

The clinical features of the HS and IBS-D patients are shown in Table 1. Samples were collected from 14 IBS-D patients and from 18 HS. The mean age and sex ratio were comparable in both groups. In IBS-D patients, stool frequency, abdominal pain, and bloating intensity were significantly increased.

Modifications of bile acid composition in feces

The levels of total fecal BA were similar in IBS-D patients and HS, with a mean $5.61 \pm 1.07 \mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$ of dried stool in IBS-D patient vs $5.23 \pm 1.34 \mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$ of dried stool in HS. The levels of primary BA in the feces of IBS-D patients were significantly increased ($15.9 \pm 5.6\%$) compared to HS ($4.1 \pm 0.4\%$, $P = 0.02$, Fig. 1A). Both primary CA and CDCA levels were significantly increased (Fig. 1B). There was a significant decrease in secondary BA in IBS-D patients vs HS ($79.8 \pm 0.7\%$ vs $94.7 \pm 0.06\%$, respectively, $P = 0.03$, Fig. 1C). The level of secondary DCA was significantly decreased, but the percentage of LCA was similar between the two populations (Fig. 1D). The percentage of fecal UDCA was similar between IBS-D patients and HS, as were the percentages of amino-conjugated and sulfo-conjugated BA (Fig. 1E).

Correlation between fecal BA composition and symptoms

A positive relationship was found between the percentage of primary BA and the Bristol score and stool frequency (Fig. 2A,B). Conversely, a negative correlation was observed between the Bristol score and stool frequency and the percentage of secondary BA (Fig. 2C,D). Abdominal pain and bloating were not significantly correlated with the fecal BA contents.

Table 1 Clinical features of healthy subjects and diarrhea-predominant IBS (IBS-D) patients

	HS	IBS-D	P
Mean age (years) \pm SD	33.7 \pm 14	39.7 \pm 7	ns
Sex ratio	7F/11M	3F/11M	ns
Mean Bristol stool scale \pm SD	2.11 \pm 0.96	5.37 \pm 1.33	<0.0001
Mean daily pain score \pm SD	0.16 \pm 0.38	3.83 \pm 2.63	<0.0001
Mean daily bloating score \pm SD	0.22 \pm 0.42	3.6 \pm 2.37	<0.0001
Mean daily stool frequency \pm SD	1.11 \pm 0.43	3.57 \pm 2.9	<0.0001

Dysbiosis in IBS-D patients

Fecal microbiota composition was assessed by real-time quantitative PCR in all of the 18 HS. For some species and due to technical issues, bacteria quantitation was only available in 13 of the IBS-D patients. The results are summarized in (Fig. 3A,B). No differences in the total fecal bacteria counts were observed. Quantitation of the *Lactobacillus* group, the *Bacteroides/Prevotella* group, the *Coccoides* group and *F. prausnitzii* were similar between the HS and IBS-D patients. The presence of the *Bifidobacterium* group was significantly decreased in the IBS-D patients. A significant increase in the total count of *E. coli* species was observed in the IBS-D patients, whereas the *Leptum* group was significantly decreased in the IBS-D patients compared to the HS.

DISCUSSION

In the present study, we observed a significant increase in fecal primary BA and a corresponding decrease in secondary BA in IBS-D patients compared to HS. The percentages of fecal primary BA were positively correlated with the Bristol stool score and stool frequency. In parallel, we also detected dysbiosis in the feces of IBS-D patients, which was characterized by a decrease in *Bifidobacterium*, an increase of *E. coli*, and lower counts of *Leptum*, which are involved in BA transformation.²⁶

The composition of the fecal BA pool has been poorly evaluated in IBS. This is the first study describing both the fecal bile acids pool composition and gut microbial content in the same patients. In our study, for the fecal analysis of BA we used HPLC-MS/MS that allows for the examination of the specific chemistry (e.g., sulfation, conjugation) of the bile acid species. This technique was adapted from the routine detection of BAs in sera, which is used in the surveillance of cholestatic diseases. Gas chromatography is the most frequently employed method to analyze the BA content of feces.^{31,32} We chose to use HPLC-MS/MS to analyze the conjugation status³³ of BA to sulfone or amino acids, which cannot be analyzed by gas chromatography. It is important to note that we did not find any differences in the levels of amino-conjugated BAs or sulfo-conjugated BAs between IBS-D patients and HS (Fig. 1E).

We found an increase in fecal primary in IBS-D patients compared to HS, and a decrease in secondary BA. This finding was correlated with lower stool consistency and higher stool frequency. This led us to discuss in which manner these changes in fecal BA

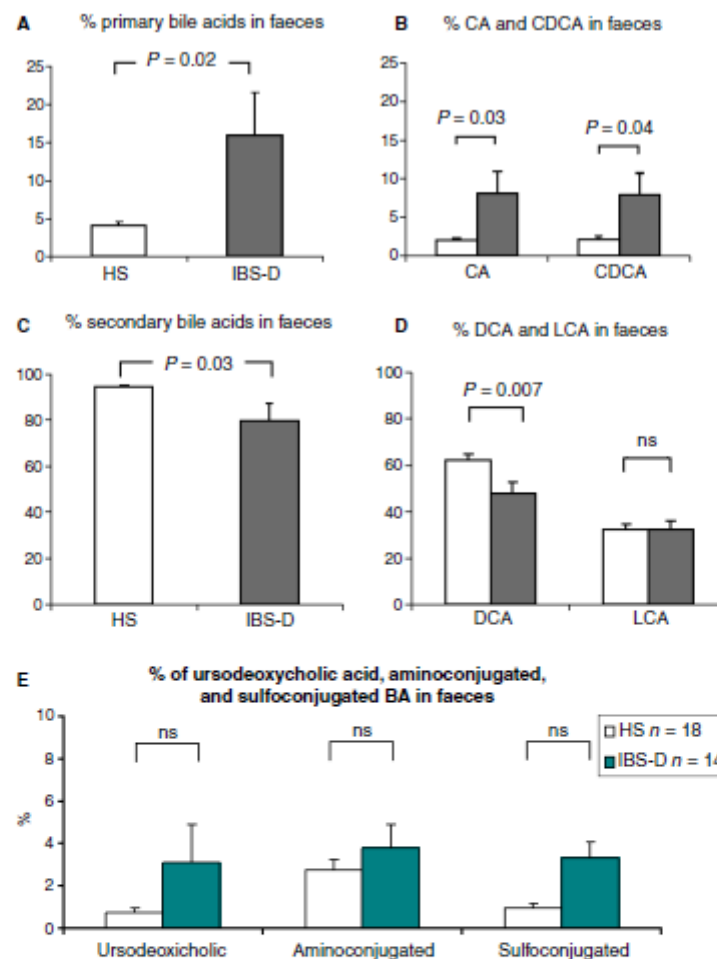


Figure 1 Description of the fecal bile acid (BA) species in healthy subjects (white bar) and diarrhea-predominant IBS patients (grey bar). (A) Percentage of total primary BA, and (C) percentage of total secondary BA in faeces. (B, D) Percentage of cholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, and lithocholic acid in faeces. (E) Percentage of ursodeoxycholic acid, Aminoconjugated BA, and Sulfoconjugated BA. All results are expressed as the mean \pm SEM.

pool should be implicated in the genesis of diarrhea. Based on an assumption of cause and effect, our results are consistent with a recent study performed in HS where oral administration of CDCA, a primary BA, significantly accelerated colonic transit, increased stool frequency and decreased stool consistency.¹² Taken together these data suggest that excess CDCA promotes diarrhea in our patients. On the contrary, the secondary DCA was decreased in IBS-D patients compared to HS and it's the most laxative BA under experimental conditions.³⁴ This point has to be discussed considering the hypothesis where the changes in the BA profile lead to diarrhea because the most

laxative BA was decreased in our IBS-D patients compared to HS. However, the real effect of DCA under *in vivo* conditions is discussed. A study performed *in vitro* found that administration of DCA at physiological concentrations can downregulate the secretion of colonic epithelial cells.³⁵ In humans, DCA has never been administered orally to HS, although CDCA has. Deoxycholic acid is also thought to be less abundant in the aqueous phase of faeces because it is more hydrophobic than CDCA and insoluble below pH 7,³⁶ and it is probably less bioactive. Therefore, the bioavailability and real effects of DCA *in vivo* are not known in humans.

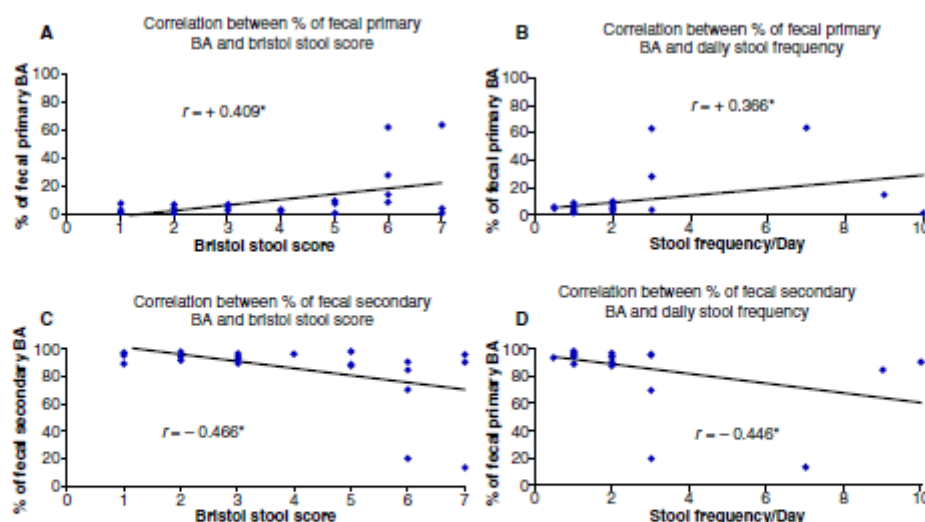


Figure 2 Correlations between the percentage of fecal primary or secondary bile acids and the Bristol stool score and the daily stool frequency using Spearman's non-parametric test. Diarrhea-predominant IBS patients and healthy subjects are here pooled. A * represents a level of significance of $P < 0.05$.

It could have been interesting to detect bile acid malabsorption (BAM) in our IBS-D patients. Bile acid malabsorption is characterized by an increase of fecal BA excretion, and BAM prevalence in IBS-D is about 30–50% in cases of chronic idiopathic diarrhea.^{19–22} Unfortunately, the BAM prevalence was not evaluable in our study because both the scintigraphic test and the blood test of 7 alpha c4 for this condition are not available in France. We expected to find a higher concentration of total fecal BA in IBS-D patients compared to HS, but the concentrations were similar between the two groups. The similar concentrations of fecal BA between the two populations are likely because the detection was performed on a single stool, and not on total daily stools, and our detection is not sufficient to eliminate the possibility of BAM. The number of stools was approximately three times more in the IBS-D group implying that the BA losses might be three times greater as well. Based on the BAM mechanism, the losses should be compensated by de novo BA synthesis by the liver, leading to a possible larger percentage of primary BAs in the feces.

Another hypothesis to explain the higher amount of primary BA in feces is a lower transformation activity of the gut microbiota. Gut microbiota is the exclusive metabolic pathway by which primary BAs are transformed into secondary BAs. Germ-free mice have a dramatic increase of primary BA compared to conventionalized mice.³⁷ We analyzed the composition of the fecal microbiota using real-time qPCR for quantitation

of bacterial species, which is considered a standard method,^{28,30} to detect a dysbiosis that could potentially lead to an increase of primary BA in IBS-D patients. We chose to study bacterial groups involved in BA transformation. Dysbiosis has been repeatedly reported in IBS patients,^{3,6,38} and the results of our fecal microbiota analysis comparing IBS-D patients and HS confirmed the published data. As reported by Malinen *et al.*, we found a lower count of *bifidobacterium* in the IBS-D patients,³ whereas the counts of *bacteroides*, *coccoides* and *F. prausnitzii* were unchanged. However, in contrast to the results reported by Malinen, we did not find any difference in *lactobacillus* levels, and we observed a significant increase in *E. coli* species that had never been reported in IBS-D patients.^{3,6,39,40} Interestingly, the *leptum* group, which contains many bacteria that can transform BA, was decreased in the IBS-D patients. The method that we used covered different bacterial species of the *leptum* group, including *Clostridium* (such as *C. leptum*, *C. methylpentosum*, *C. sporosphaeroides*), some *Ruminococcus* (such as *R. albus*, *R. callidus*, *R. flavefaciens*, *R. bromii*), and *F. prausnitzii*. We specifically looked at *F. prausnitzii* spp. because it is a major component of the *leptum* group that is not able to transform BA *in vitro*.⁴¹ The counts of *F. prausnitzii* in the IBS-D patients and HS were similar. This finding strongly suggests that a decrease in the *leptum* group may involve *Ruminococcus* or other *Clostridia* that are well known to perform BA transformation. Further work should specifically

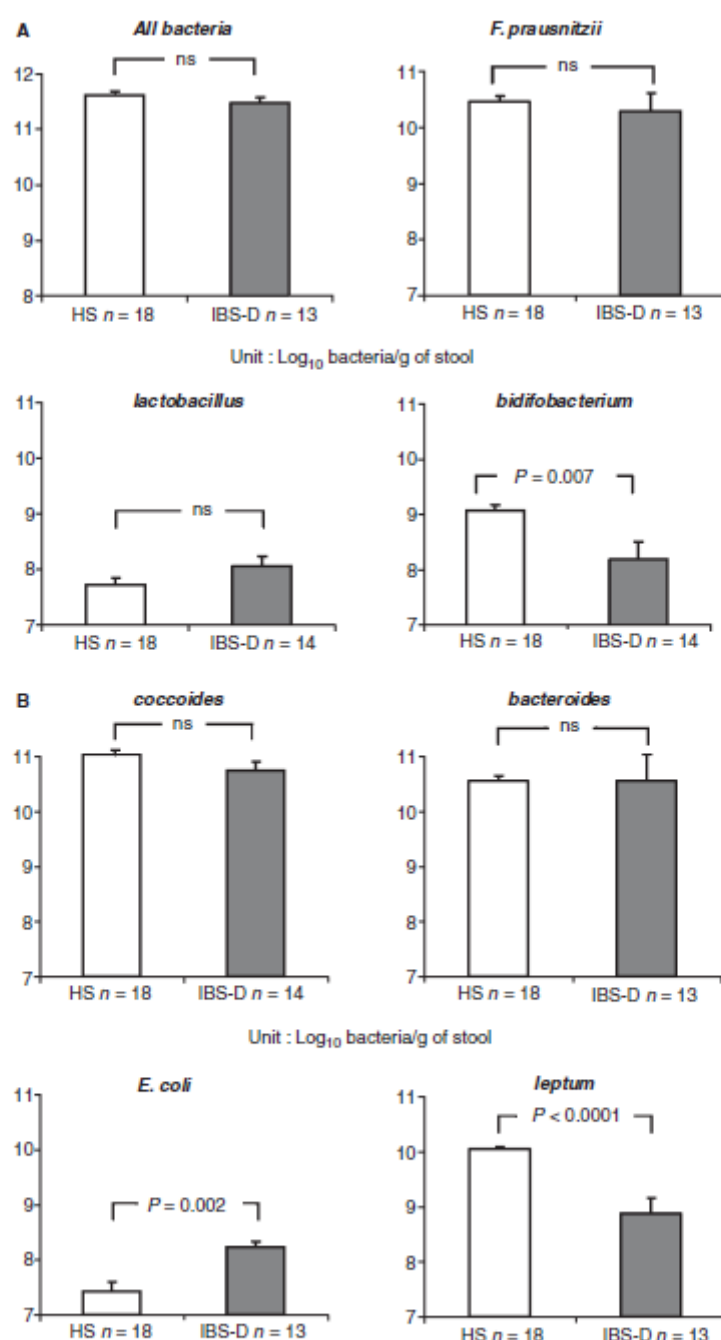


Figure 3 Comparison of fecal counts (A) in all bacteria, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and (B) of the main fecal bacterial groups that transform bile acid (*coccoïdes*, *bacteroides*, *Escherichia coli*, and *leptum*) in feces of healthy subjects (white bar) and diarrhea-predominant IBS patients (gray bar) by quantitative polymerase chain reaction. All results are expressed in log₁₀ bacteria per gram of stool.

quantitate those *Ruminococcus* spp. and other *Clostridium* spp. in IBS-D patients to better identify their roles in increasing the levels of fecal primary BA. The observed decrease in the *leptum* group could induce a lower transformation activity of the microbiota, leading to an increase in the levels of primary BAs and a decrease in the levels of secondary BAs. It is interesting to note that if BAs are beneficial metabolic substrates for bacteria, they are also antimicrobial molecules in high concentrations. Dysbiosis could theoretically also be the consequence of variations in the concentration of fecal BA.

For some authors, IBS is considered to be characterized by a low intestinal inflammation level. *F. prausnitzii* deficiency is the most well-described biomarker of dysbiosis associated with inflammatory bowel disease. We observed that the *F. prausnitzii* count was similar in IBS-D patients and HS, demonstrating that IBS-D dysbiosis differs from that described in IBD.^{28,29}

Without a functional assay to compare the capacity of transformation of BA by feces, our results do not show a direct causal link, but they support the hypothesis of a functional disorder attributable to dysbiosis. The significant correlation between the Bristol stool score, the stool frequency, and the levels of primary BA raise the problem of the transit time: primary transit time acceleration theoretically suggests that less time would be available for BA transformation by bacteria, which would result in an increase in primary BA in the stool. However, a primary dysbiosis can result in lower BA transformation as evidenced by an increase in primary BAs such as CDCA, which results in transit acceleration and a decrease in stool consistency. To better understand the respective roles of transit time and bacterial 7 α -dehydroxylation in the changes in fecal BA pool composition, it would be interesting in further studies to include an *in vivo* transit time assay, and *in vitro* dehydroxylation kinetic assay using patients' fresh stools samples in an anaerobic chamber.

BAs have been involved in visceral hypersensitivity, both in animals and humans.^{11,42,43} Perfusion studies have shown that rectal infusion of DCA increases the sensitivity of the rectum to distension and promotes a desire to defecate in HS.¹¹ It is noteworthy that in our study there was no correlation between pain intensity and fecal BA composition.

In conclusion, we observed differences in the fecal BA pool between IBS-D patients and HS. The gut microbiota analysis revealed a dysbiosis in the feces of IBS-D patients, marked by an increase in *E. coli* and lower levels of *bifidobacterium* and *leptum*. As the gut microbiota is the exclusive pathway for the transformation of BA, this finding suggests a lower metabolic activity of the microbiota leading to an imbalance in the BA pool. Further studies will be necessary to better understand the relationship between the fecal BA pool composition, the gut microbiota, and the diarrhea pathogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Prof Jan Sjövall from the Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, SE-17177 Stockholm, Sweden, for his help and advice regarding fecal bile acid pool composition. American Journal Experts has improved the English language; this has been financed by the 'Association pour l'Etude des Fonctions Digestives', Asnières sur seine, France.

FUNDING

This work was supported by a research grant from CEPHALON Inc., and a grant from BIOCODEX Inc.

DISCLOSURE

No competing interests declared.

AUTHOR CONTRIBUTION

HD, DR, SR, LH, DF, MM, and VG performed the research and the experiments; HD, PJ, DB, PS, HS, BC, and JMS wrote the paper; HD, BC, and JMS designed the study, analyzed the data.

REFERENCES

- Liu J, Hou X. A review of the irritable bowel syndrome investigation on epidemiology, pathogenesis and pathophysiology in China. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(Suppl. 3): 88–93.
- Choung RS, Locke GR 3rd. Epidemiology of IBS. *Gastroenterol Clin North Am* 2011; 40: 1–10.
- Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkituokko H et al. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 2007; 133: 24–33.
- Matto J, Maunukela L, Kajander K et al. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome – a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 213–22.
- Lyra A, Rinttilä T, Nikkila J et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5936–45.
- Malinen E, Rinttilä T, Kajander K et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients

- and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 373–82.
- 7 Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; **136**: 65–80.
 - 8 Falconer JD, Smith AN, Eastwood MA. The effects of bile acids on colonic motility in the rabbit. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1980; **65**: 135–44.
 - 9 Kirwan WO, Smith AN, Mitchell WD *et al*. Bile acids and colonic motility in the rabbit and the human. *Gut* 1975; **16**: 894–902.
 - 10 Wienbeck M, Karaus M. The effects of deoxycholic and ricinoleic acid on the isolated circular muscle of the cat colon are modified by leucine-enkephalin. *Z Gastroenterol* 1983; **21**: 365–72.
 - 11 Edwards CA, Brown S, Baxter AJ *et al*. Effect of bile acid on anorectal function in man. *Gut* 1989; **30**: 383–6.
 - 12 Odunsi-Shiyanbade ST, Camilleri M, McKinzie S *et al*. Effects of chenodeoxycholate and a bile acid sequestrant, colestesvelam, on intestinal transit and bowel function. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; **8**: 159–65.
 - 13 Bajor A, Gillberg PG, Abrahamsson H. Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scand J Gastroenterol* 2010; **45**: 645–64.
 - 14 Freel RW, Hatch M, Eamest DL *et al*. Dihydroxy bile salt-induced alterations in NaCl transport across the rabbit colon. *Am J Physiol* 1983; **245**: G808–15.
 - 15 Munch A, Strom M, Soderholm JD. Dihydroxy bile acids increase mucosal permeability and bacterial uptake in human colon biopsies. *Scand J Gastroenterol* 2007; **42**: 1167–74.
 - 16 Raimondi F, Santoro P, Barone MV *et al*. Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *Am J Physiol* 2008; **294**: G906–13.
 - 17 Chadwick VS, Gaginella TS, Carlson GL *et al*. Effect of molecular structure on bile acid-induced alterations in absorptive function, permeability, and morphology in the perfused rabbit colon. *J Lab Clin Med* 1979; **94**: 661–74.
 - 18 Gordon SJ, Kinsey MD, Magen JS *et al*. Structure of bile acids associated with secretion in the rat cecum. *Gastroenterology* 1979; **77**: 38–44.
 - 19 Wildt S, Norby Rasmussen S, Lysgard Madsen J *et al*. Bile acid malabsorption in patients with chronic diarrhoea: clinical value of SeHCAT test. *Scand J Gastroenterol* 2003; **38**: 826–30.
 - 20 Balzer K, Schmitt G, Reiners C *et al*. [Results of the 75selenium homotaurocholic acid retention test (SeHCAT test) in diagnosis of diarrhea]. *Med Klin (Munich)* 1995; **90**: 27–32.
 - 21 Kurien M, Evans KE, Leeds JS *et al*. Bile acid malabsorption: an under-investigated differential diagnosis in patients presenting with diarrhea predominant irritable bowel syndrome type symptoms. *Scand J Gastroenterol* 2011; **46**: 818–22.
 - 22 Hofmann AF. Chronic diarrhea caused by idiopathic bile acid malabsorption: an explanation at last. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; **3**: 461–4.
 - 23 Simren M, Bajor A, Gillberg PG *et al*. Randomised clinical trial: the ileal bile acid transporter inhibitor A3309 vs. placebo in patients with chronic idiopathic constipation – a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **34**: 41–50.
 - 24 Chey WD, Camilleri M, Chang L *et al*. A randomized placebo-controlled phase IIb trial of A3309, a bile acid transporter inhibitor, for chronic idiopathic constipation. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 1803–12.
 - 25 Mekjian HS, Phillips SF, Hofmann AF. Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids: perfusion studies in man. *J Clin Invest* 1971; **50**: 1569–77.
 - 26 Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006; **47**: 241–59.
 - 27 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD *et al*. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1480–91.
 - 28 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L *et al*. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn's disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 16731–6.
 - 29 Sokol H, Seksik P, Furet JP *et al*. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Dis* 2009; **15**: 1183–9.
 - 30 Furet JP, Firmesse O, Goumion M *et al*. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; **68**: 351–62.
 - 31 Tadano T, Kanoh M, Kondoh H *et al*. Kinetic analysis of bile acids in the feces of colorectal cancer patients by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Rinsho byori* 2007; **55**: 417–27.
 - 32 Tadano T, Kanoh M, Matsumoto M *et al*. Studies of serum and feces bile acids determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Rinsho byori* 2006; **54**: 103–10.
 - 33 Hofmann AF, Loening-Baucke V, Lavine JE *et al*. Altered bile acid metabolism in childhood functional constipation: inactivation of secretory bile acids by sulfation in a subset of patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; **47**: 598–606.
 - 34 Keely SJ, Scharl MM, Bertelsen LS *et al*. Bile acid-induced secretion in polarized monolayers of T84 colonic epithelial cells: structure-activity relationships. *Am J Physiol* 2007; **292**: G290–7.
 - 35 Keating N, Mroz MS, Scharl MM *et al*. Physiological concentrations of bile acids down-regulate agonist induced secretion in colonic epithelial cells. *J Cell Mol Med* 2009; **13**: 2293–303.
 - 36 Norman A. Faecal excretion products of cholic acid in man. *Br J Nutr* 1964; **18**: 173–86.
 - 37 Duboc H, Rainteau D, Seksik P. Linking dysbiosis, dysmetabolism of bile acids and inflammation in IBD. Presented at French Meeting of Hepatogastroenterology and Digestive Oncology March 2010, Paris, France.
 - 38 Collins SM, Denou E, Verdu EF *et al*. The putative role of the intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2009; **41**: 850–3.
 - 39 Balsari A, Ceccarelli A, Dubini F *et al*. The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica* 1982; **5**: 185–94.
 - 40 Krogus-Kurikka L, Lyra A, Malinen E *et al*. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol* 2009; **17**: 95.
 - 41 Duboc H, Rainteau D, Seksik P. Dysbiosis in inflammatory bowel disease leads to dysmetabolism of bile acids. Presented at Digestive Disease Week 2009, Chicago, IL, USA.
 - 42 Rampton PA, Dinning PG, Kennedy ML *et al*. The proximal colonic motor response to rectal mechanical and chemical stimulation. *Am J Physiol* 2002; **282**: G443–9.
 - 43 Traub RJ, Tang B, Ji Y *et al*. A rat model of chronic postinflammatory visceral pain induced by deoxycholic acid. *Gastroenterology* 2008; **135**: 2075–83.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Twenty-eight bile acid species available for standard solution and quantitation in feces by HPLC MS/MS.

Table S2. Primer sequences targeting bacterial groups used for fecal qPCR analysis.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

REFERENCES

1. Louis E, Mary JY, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, et al. Maintenance of remission among patients with Crohn's disease on antimetabolite therapy after infliximab therapy is stopped. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):63-70 e5.
2. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol*. 1995 Jul;30(7):699-706.
3. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*. 2000 Feb;6(1):8-15.
4. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001 Dec;49(6):777-82.
5. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2002 Jul;8(4):244-50.
6. Silverstein MD, Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Feagan BG, Nietert PJ, et al. Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology*. 1999 Jul;117(1):49-57.
7. Greenstein AJ, Lachman P, Sachar DB, Springhorn J, Heimann T, Janowitz HD, et al. Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut*. 1988 May;29(5):588-92.
8. D'Haens GR, Sartor RB, Silverberg MS, Petersson J, Rutgeerts P. Future directions in inflammatory bowel disease management. *J Crohns Colitis*. 2014 Aug 1;8(8):726-34.
9. Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VB, Fonseca MT, Bonfa G, Nardini V, et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2015 Feb;48(2):96-107.
10. Amiot A, Peyrin-Biroulet L. Current, new and future biological agents on the horizon for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Therap Adv Gastroenterol*. 2015 Mar;8(2):66-82.
11. Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre JP, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2006 Mar;130(3):650-6.
12. Loly C, Belaiche J, Louis E. Predictors of severe Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2008 Aug;43(8):948-54.
13. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Vatn MH, Moum B. Are there any differences in phenotype or disease course between familial and sporadic cases of inflammatory bowel disease? Results of a population-based follow-up study. *Am J Gastroenterol*. 2007 Sep;102(9):1955-63.
14. Solberg IC, Vatn MH, Hoie O, Stray N, Sauar J, Jahnsen J, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Dec;5(12):1430-8.
15. Wolters FL, Russel MG, Sijbrandij J, Ambergen T, Odes S, Riis L, et al. Phenotype at diagnosis predicts recurrence rates in Crohn's disease. *Gut*. 2006 Aug;55(8):1124-30.
16. Beaugerie L, Sokol H. Clinical, serological and genetic predictors of inflammatory bowel disease course. *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 7;18(29):3806-13.
17. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94.
18. Carbonnel F, Macaigne G, Beaugerie L, Gendre JP, Cosnes J. Crohn's disease severity in familial and sporadic cases. *Gut*. 1999 Jan;44(1):91-5.
19. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002 Sep;123(3):679-88.

20. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg.* 2005 Nov;242(5):693-700.
21. Renda MC, Cottone M. Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in the Sicilian population. *Am J Gastroenterol.* 2008 Jan;103(1):248-9.
22. Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Inca R, Guariso G, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007 Feb;44(2):171-9.
23. Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol.* 2003 Sep;178(3):339-46.
24. Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun.* 2004 Nov;5(7):530-9.
25. Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2005 Jun;128(7):2020-8.
26. Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, Drummond HE, Smith BK, Targan SR, et al. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol.* 2004 Dec;99(12):2376-84.
27. Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, Gaiennie J, Yang H, Targan SR. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut.* 2000 Oct;47(4):487-96.
28. Dubinsky M. What is the role of serological markers in IBD? Pediatric and adult data. *Dig Dis.* 2009;27(3):259-68.
29. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut.* 2005 Mar;54(3):364-8.
30. Yamamoto T, Shiraki M, Bamba T, Umegae S, Matsumoto K. Fecal calprotectin and lactoferrin as predictors of relapse in patients with quiescent ulcerative colitis during maintenance therapy. *Int J Colorectal Dis.* 2014 Apr;29(4):485-91.
31. Shen J, Qiao Y, Ran Z, Wang T, Xu J, Feng J. Intestinal protein expression profile identifies inflammatory bowel disease and predicts relapse. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(5):917-25.
32. Montero-Melendez T, Llor X, Garcia-Planella E, Perretti M, Suarez A. Identification of novel predictor classifiers for inflammatory bowel disease by gene expression profiling. *PLoS One.* 2013;8(10):e76235.
33. Hellers G. Crohn's disease in Stockholm county 1955-1974. A study of epidemiology, results of surgical treatment and long-term prognosis. *Acta Chir Scand Suppl.* 1979;490:1-84.
34. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Ann Surg.* 2000 Jan;231(1):38-45.
35. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1996 Feb;110(2):424-31.
36. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1990 Oct;99(4):956-63.
37. Dubinsky MC, Mei L, Friedman M, Dhere T, Haritunians T, Hakonarson H, et al. Genome wide association (GWA) predictors of anti-TNFalpha therapeutic responsiveness in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Aug;16(8):1357-66.
38. Jurgens M, Laubender RP, Hartl F, Weidinger M, Seiderer J, Wagner J, et al. Disease activity, ANCA, and IL23R genotype status determine early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2010 Aug;105(8):1811-9.

39. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 14;486(7402):207-14.
40. Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Is it time for a metagenomic basis of therapeutics? *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1253-5.
41. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009 Dec 18;326(5960):1694-7.
42. Reyes A, Wu M, McNulty NP, Rohwer FL, Gordon JI. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 10;110(50):20236-41.
43. de Muinck EJ, Stenseth NC, Sachse D, Vander Roost J, Ronningen KS, Rudi K, et al. Context-dependent competition in a model gut bacterial community. *PLoS One*. 2013;8(6):e67210.
44. Jakobsson HE, Rodriguez-Pineiro AM, Schutte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep*. 2015 Feb;16(2):164-77.
45. Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sanchez SE, Silva GG, Boling L, et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun*. 2014;5:4498.
46. Mukhopadhyay I, Hansen R, Meharg C, Thomson JM, Russell RK, Berry SH, et al. The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect*. 2014 Dec 15.
47. Blais Lecours P, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Hache C, Bourdages R, et al. Increased prevalence of *Methanospaera stadtmanae* in inflammatory bowel diseases. *PLoS One*. 2014;9(2):e87734.
48. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Jul;51(1):77-84.
49. Salazar N, Arboleya S, Valdes L, Stanton C, Ross P, Ruiz L, et al. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet*. 2014;5:406.
50. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003 Feb;52(2):237-42.
51. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res*. 2012 Oct;160(4):246-57.
52. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis*. 2007 Jan 15;44(2):256-62.
53. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4554-61.
54. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11070-5.
55. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):121-41.
56. Prakash T, Oshima K, Morita H, Fukuda S, Imaoka A, Kumar N, et al. Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of Th17 cell differentiation. *Cell Host Microbe*. 2011 Sep 15;10(3):273-84.
57. Collins S, Verdu E, Denou E, Bercik P. The role of pathogenic microbes and commensal bacteria in irritable bowel syndrome. *Dig Dis*. 2009;27 Suppl 1:85-9.
58. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480-4.
59. Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS One*. 2012;7(6):e39315.

60. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottiere HM, Raes J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*. 2013 Jan;62(1):146-58.
61. Rondon MR, Raffel SJ, Goodman RM, Handelsman J. Toward functional genomics in bacteria: analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6451-5.
62. Niedringhaus TP, Milanova D, Kerby MB, Snyder MP, Barron AE. Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal Chem*. 2011 Jun 15;83(12):4327-41.
63. Sorek R, Zhu Y, Creevey CJ, Francino MP, Bork P, Rubin EM. Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science*. 2007 Nov 30;318(5855):1449-52.
64. Morgan XC, Huttenhower C. Meta'omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology*. 2014 May;146(6):1437-48 e1.
65. Gosalbes MJ, Durban A, Pignatelli M, Abellan JJ, Jimenez-Hernandez N, Perez-Cobas AE, et al. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One*. 2011;6(3):e17447.
66. Turnbaugh PJ, Gordon JL. An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. *Cell*. 2008 Sep 5;134(5):708-13.
67. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1767-73.
68. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.
69. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet*. 1994 Mar 26;343(8900):766-7.
70. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995 Oct;109(4):1344-67.
71. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):44-54.
72. Harper PH, Lee EC, Kettlewell MG, Bennett MK, Jewell DP. Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut*. 1985 Mar;26(3):279-84.
73. Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. 1991 Sep 28;338(8770):771-4.
74. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2000 Aug;119(2):305-9.
75. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, et al. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*. 2004 Jan;53(1):108-14.
76. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1202-9.
77. Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. 2004 Nov;53(11):1617-23.
78. Matthes H, Krummenerl T, Giensch M, Wolff C, Schulze J. Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:13.

79. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):635-9.
80. Malchow HA. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol*. 1997 Dec;25(4):653-8.
81. Plein K, Hotz J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study. *Z Gastroenterol*. 1993 Feb;31(2):129-34.
82. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2000 Jul;45(7):1462-4.
83. Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Feb;12(2):106-11.
84. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007 Sep;1(5):403-18.
85. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21;104(34):13780-5.
86. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006 Feb;55(2):205-11.
87. Sokol H, Lay C, Seksik P, Tannock GW. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Jun;14(6):858-67.
88. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004 Aug;127(2):412-21.
89. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9):R79.
90. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, et al. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):891-906.
91. Maharshak N, Packey CD, Ellermann M, Manick S, Siddle JP, Huh EY, et al. Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. *Gut Microbes*. 2013 Jul-Aug;4(4):316-24.
92. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenkov T, Michaud M, DuBois A, Delaney ML, et al. Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*. 2010 Sep 16;8(3):292-300.
93. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011 May 27;145(5):745-57.
94. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004 Jan;53(1):1-4.
95. Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell*. 2007 Oct 5;131(1):33-45.
96. Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, Barry NA, Stefanowski J, Hao L, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1000-10.
97. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):485-98.

98. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*. 2009 Oct 16;31(4):677-89.
99. Szczesnak A, Segata N, Qin X, Gevers D, Petrosino JF, Huttenhower C, et al. The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment. *Cell Host Microbe*. 2011 Sep 15;10(3):260-72.
100. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Aug;15(8):1183-9.
101. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011 Jan 21;331(6015):337-41.
102. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):232-6.
103. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013 Aug 2;341(6145):569-73.
104. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16731-6.
105. Zhang M, Qiu X, Zhang H, Yang X, Hong N, Yang Y, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PLoS One*. 2014;9(10):e109146.
106. Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*. 2011 May 20;332(6032):974-7.
107. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*. 2007 Feb;6(2):546-51.
108. Jansson J, Willing B, Lucio M, Fekete A, Dicksved J, Halfvarson J, et al. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *PLoS One*. 2009;4(7):e6386.
109. Takahashi D, Shukla SK, Prakash O, Zhang G. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*. 2010 Sep;92(9):1236-41.
110. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol*. 2007 Apr;19(2):70-83.
111. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*. 2010 Apr;135(1):1-11.
112. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004 Nov;53(11):1658-64.
113. Chakraborty K, Ghosh S, Koley H, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Saha DR, et al. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2008 Dec;10(12):2520-37.
114. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene *Atg16l1* in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008 Nov 13;456(7219):259-63.
115. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Jul;9(4):215-23.

116. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*. 2008 Jul;57(7):903-10.
117. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):241-59.
118. Batta AK, Salen G, Arora R, Shefer S, Batta M, Person A. Side chain conjugation prevents bacterial 7-dehydroxylation of bile acids. *J Biol Chem*. 1990 Jul 5;265(19):10925-8.
119. Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res*. 2009 Dec;50(12):2340-57.
120. Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev*. 2003 Jul 1;17(13):1581-91.
121. Scotti E, Gilardi F, Godio C, Gers E, Krneta J, Mitro N, et al. Bile acids and their signaling pathways: eclectic regulators of diverse cellular functions. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Oct;64(19-20):2477-91.
122. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res*. 2009 Aug;50(8):1509-20.
123. Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Haussinger D. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 18;372(1):78-84.
124. Wang YD, Chen WD, Yu D, Forman BM, Huang W. The G-Protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice. *Hepatology*. 2011 Oct;54(4):1421-32.
125. Greve JW, Gouma DJ, Buurman WA. Bile acids inhibit endotoxin-induced release of tumor necrosis factor by monocytes: an in vitro study. *Hepatology*. 1989 Oct;10(4):454-8.
126. Pols TW, Nomura M, Harach T, Lo Sasso G, Oosterveer MH, Thomas C, et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab*. 2011 Dec 7;14(6):747-57.
127. Fiorucci S, Cipriani S, Baldelli F, Mencarelli A. Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders. *Prog Lipid Res*. 2010 Apr;49(2):171-85.
128. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):9435-40.
129. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):484-9.
130. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 1;329(1):386-90.
131. Hov JR, Keitel V, Laerdahl JK, Spomer L, Ellinghaus E, ElSharawy A, et al. Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis. *PLoS One*. 2010;5(8):e12403.
132. Cipriani S, Mencarelli A, Chini MG, Distrutti E, Renga B, Bifulco G, et al. The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PLoS One*. 2011;6(10):e25637.
133. Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, et al. TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. *Immunology*. 2013 May;139(1):19-29.
134. Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 23;110(30):12450-5.
135. Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, et al. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol*. 2003 Oct;185(20):6220-3.

136. Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*. 2010 Jul 15;466(7304):334-8.
137. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2015 Jan 29;160(3):447-60.
138. Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):142-50.
139. Duerkop BA, Clements CV, Rollins D, Rodrigues JL, Hooper LV. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 23;109(43):17621-6.
140. Waller AS, Yamada T, Kristensen DM, Kultima JR, Sunagawa S, Koonin EV, et al. Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes. *ISME J*. 2014 Jul;8(7):1391-402.
141. Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, Novick RP, et al. beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2006 Apr;188(7):2726-9.
142. Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis*. 2000 Feb;181(2):664-70.
143. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*. 2010 Jun 25;141(7):1135-45.
144. Basic M, Keubler LM, Buettner M, Achard M, Breves G, Schroder B, et al. Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Mar;20(3):431-43.
145. Sun L, Nava GM, Stappenbeck TS. Host genetic susceptibility, dysbiosis, and viral triggers in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011 Jul;27(4):321-7.
146. Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ngando T, Dore J, Leclerc M. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut*. 2008 Mar;57(3):424-5.
147. Perez-Brocal V, Garcia-Lopez R, Vazquez-Castellanos JF, Nos P, Beltran B, Latorre A, et al. Study of the viral and microbial communities associated with Crohn's disease: a metagenomic approach. *Clin Transl Gastroenterol*. 2013;4:e36.
148. Gorard DA, Hunt JB, Payne-James JJ, Palmer KR, Rees RG, Clark ML, et al. Initial response and subsequent course of Crohn's disease treated with elemental diet or prednisolone. *Gut*. 1993 Sep;34(9):1198-202.
149. Gonzalez-Huix F, de Leon R, Fernandez-Banares F, Esteve M, Cabre E, Acero D, et al. Polymeric enteral diets as primary treatment of active Crohn's disease: a prospective steroid controlled trial. *Gut*. 1993 Jun;34(6):778-82.
150. Soo J, Malik BA, Turner JM, Persad R, Wine E, Siminoski K, et al. Use of exclusive enteral nutrition is just as effective as corticosteroids in newly diagnosed pediatric Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2013 Dec;58(12):3584-91.
151. Yamamoto T, Shiraki M, Nakahigashi M, Umegae S, Matsumoto K. Enteral nutrition to suppress postoperative Crohn's disease recurrence: a five-year prospective cohort study. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Mar;28(3):335-40.
152. Takagi S, Utsunomiya K, Kuriyama S, Yokoyama H, Takahashi S, Iwabuchi M, et al. Effectiveness of an 'half elemental diet' as maintenance therapy for Crohn's disease: A randomized-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Nov 1;24(9):1333-40.
153. Cortot A, Pineton de Chambrun G, Vernier-Massouille G, Vigneron B, Gower Rousseau C. [Inflammatory bowel disease: genetic or environmental diseases?]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009 Aug-Sep;33(8-9):681-91.

154. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2011 Apr;106(4):563-73.
155. Richman E, Rhodes JM. Review article: evidence-based dietary advice for patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Nov;38(10):1156-71.
156. O'Sullivan M, O'Morain C. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20(3):561-73.
157. de Wouters T, Dore J, Lepage P. Does our food (environment) change our gut microbiome ('in-vironment'): a potential role for inflammatory bowel disease? *Dig Dis*. 2012;30 Suppl 3:33-9.
158. Le Gall G, Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Jamieson C, Johnson IT, et al. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Proteome Res*. 2011 Sep 2;10(9):4208-18.
159. Kono H, Fujii H, Ishii K, Hosomura N, Ogiku M. Dietary medium-chain triglycerides prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res*. 2010 Mar;155(3):131-41.
160. Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M, Berdowska I, Zielinski B, et al. Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Jan;15(1):93-9.
161. Karban A, Hartman C, Eliakim R, Waterman M, Nesher S, Barnett-Griness O, et al. Paraoxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2007 Oct;52(10):2707-15.
162. Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):15064-9.
163. Fu J, Wei B, Wen T, Johansson ME, Liu X, Bradford E, et al. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*. 2011 Apr;121(4):1657-66.
164. Chow J, Tang H, Mazmanian SK. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol*. 2011 Aug;23(4):473-80.
165. Kelly D, Mulder IE. Microbiome and immunological interactions. *Nutr Rev*. 2012 Aug;70 Suppl 1:S18-30.
166. Sokol H, Cosnes J, Chazouilleres O, Beaugerie L, Tiret E, Poupon R, et al. Disease activity and cancer risk in inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol*. 2008 Jun 14;14(22):3497-503.
167. Ananthakrishnan AN, Beaulieu DB, Ulitsky A, Zadvornova Y, Skaros S, Johnson K, et al. Does primary sclerosing cholangitis impact quality of life in patients with inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Mar;16(3):494-500.
168. Kwon RS, Carey MC. Do steroids ameliorate bile acid malabsorption in Crohn's disease? *Gut*. 2004 Jan;53(1):10-1.
169. Pereira SP, Bain IM, Kumar D, Dowling RH. Bile composition in inflammatory bowel disease: ileal disease and colectomy, but not colitis, induce lithogenic bile. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Apr 1;17(7):923-33.
170. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Davies G, et al. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut*. 2007 Aug;56(8):1173-4.
171. Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13580-5.
172. Narushima S, Itoha K, Miyamoto Y, Park SH, Nagata K, Kuruma K, et al. Deoxycholic acid formation in gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria. *Lipids*. 2006 Sep;41(9):835-43.

173. Narushima S, Itoh K, Takamine F, Uchida K. Absence of cecal secondary bile acids in gnotobiotic mice associated with two human intestinal bacteria with the ability to dehydroxylate bile acids in vitro. *Microbiol Immunol*. 1999;43(9):893-7.
174. Narushima S, Ito K, Kuruma K, Uchida K. Composition of cecal bile acids in ex-germfree mice inoculated with human intestinal bacteria. *Lipids*. 2000 Jun;35(6):639-44.
175. Alnouti Y. Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci*. 2009 Apr;108(2):225-46.
176. Cowen AE, Korman MG, Hofmann AF, Cass OW, Coffin SB. Metabolism of lithocholate in healthy man. II. Enterohepatic circulation. *Gastroenterology*. 1975 Jul;69(1):67-76.
177. Hamilton JP, Xie G, Raufman JP, Hogan S, Griffin TL, Packard CA, et al. Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jul;293(1):G256-63.
178. Meinel W, Sczesny S, Brigelius-Flohe R, Blaut M, Glatt H. Impact of gut microbiota on intestinal and hepatic levels of phase 2 xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Drug Metab Dispos*. 2009 Jun;37(6):1179-86.
179. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6251-61.
180. Calmus Y, Guehot J, Podevin P, Bonnefils MT, Giboudeau J, Poupon R. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes. *Hepatology*. 1992 Sep;16(3):719-23.
181. Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Schwind B, et al. Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Jul;14(7):745-52.
182. Elphick D, Liddell S, Mahida YR. Impaired luminal processing of human defensin-5 in Crohn's disease: persistence in a complex with chymotrypsinogen and trypsin. *Am J Pathol*. 2008 Mar;172(3):702-13.
183. Varela E, Manichanh C, Gallart M, Torrejon A, Borruel N, Casellas F, et al. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Jul;38(2):151-61.
184. Huijghebaert S, Parmentier G, Eyssen H. Specificity of bile salt sulfatase activity in man, mouse and rat intestinal microflora. *J Steroid Biochem*. 1984 Apr;20(4A):907-12.
185. Van Eldere J, Robben J, De Pauw G, Merckx R, Eyssen H. Isolation and identification of intestinal steroid-desulfating bacteria from rats and humans. *Appl Environ Microbiol*. 1988 Aug;54(8):2112-7.
186. Sun J, Mustafi R, Cerda S, Chumsangsri A, Xia YR, Li YC, et al. Lithocholic acid down-regulation of NF-kappaB activity through vitamin D receptor in colonic cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Jul;111(1-2):37-40.
187. Peyrin-Biroulet L, Beisner J, Wang G, Nuding S, Oommen ST, Kelly D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 11;107(19):8772-7.
188. D'Aldebert E, Biyeyeme Bi Mve MJ, Mergey M, Wendum D, Firrincieli D, Coilly A, et al. Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium. *Gastroenterology*. 2009 Apr;136(4):1435-43.

Conséquences physiopathologiques de la dysbiose associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Résumé

Ces dernières années, l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathogénie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) a été mise en évidence. Le but de nos travaux est de déterminer l'impact de la dysbiose sur l'écosystème intestinal au cours des MICI.

Ces trois études nous ont permis de confirmer le rôle central de la dysbiose associée aux MICI : d'une part comme outil potentiellement prédictif de rechute, précédant une inflammation locale ou systémique, d'autre part comme acteur dans l'apparition d'un déséquilibre de l'écosystème intestinal. Ce déséquilibre est marqué par l'altération de l'activité enzymatique du microbiote modifiant le pool d'acides biliaires dans la lumière intestinale et pouvant affecter les effets anti-inflammatoires de certains acides biliaires sur les cellules épithéliales intestinales participant ainsi à une inflammation chronique au cours des MICI. Par ailleurs, cette dysbiose est possiblement entretenue par un déficit en défensine hBD1 et HD5, perpétuant une inflammation chronique intestinale.

Ces résultats renforcent le rôle prééminent du microbiote dans l'évolution des MICI et suggèrent que la restauration de la normobiose au cours de la maladie devrait être un nouveau but dans la prise en charge de ces patients.

Mots-clés : dysbiose, MICI, acides biliaires, défensines, facteur prédictif

Résumé en anglais

In recent years, the involvement of intestinal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) has been established. The aim of our study was to determine the impact of dysbiosis in intestinal ecosystem of IBD patients.

These three studies allowed us to confirm the fundamental role of IBD-associated dysbiosis.

First, IBD-associated dysbiosis has been identified as a potential predictive tool of relapse, before local or systemic inflammation. Second, IBD-associated dysbiosis has been involved as an actor in the emergence of an imbalance of intestinal ecosystem. This imbalance was characterised by an alteration of microbiota enzymatic activity leading to modifications in the luminal bile acid pool composition and may affect the anti-inflammatory effects of some bile acids on gut epithelial cells and could participate in the chronic inflammation loop of IBD. Moreover, a deficiency in the antimicrobial defense systems of defensins may be an explanation for the break of the antibacterial barrier function in inflammatory bowel diseases maintaining dysbiosis.

These results reinforce the prominent role of the microbiota in the development of IBD and suggest that restoring normobiosis could be a new goal for optimal IBD management.

Key words: dysbiosis, IBD, bile acid, defensin, predictors